



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“VALIDACIÓN DE LA PRUEBA DE ESTERILIDAD MEDIANTE
LA TÉCNICA DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA Y
DETERMINACIÓN DE PIRÓGENOS EN EL PRODUCTO
FARMACEÚTICO INYECTABLE -INTRAVIT 10.000 BLISPACK-
DE LA EMPRESA GINSBERG ECUADOR S.A.”**

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR

MARTHA GIMENA BARRERA ORELLANA

RIOBAMBA – ECUADOR

2014

DEDICATORIA

Principalmente a Dios, quién me dio fuerza, sabiduría y valor para superar obstáculos y dificultades y así culminar con éxito esta etapa de mi vida.

A mis padres quienes se han convertido en un pilar fundamental en cada momento del transcurso de mi vida, gracias por brindarme su apoyo, comprensión, amor y confianza.

A mis hermanos, que con sus consejos me han ayudado a afrontar los retos que se me han presentado a lo largo de mi vida.

A mis amigas y amigos, que siempre han estado presentes en todo momento, acompañándome en cada alegría y tristeza, gracias por el apoyo y la amistad que perdurará como algo valioso en mi corazón.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por haberme guiado y acompañado a lo largo de mi carrera, por convertirse en mi fortaleza en los momentos de debilidad y por llenar mi vida de experiencias inolvidables, sabiduría, aprendizajes y sobre todo de mucha felicidad.

A mi familia, por apoyarme en todo momento, por brindarme su confianza, gracias por sus consejos y valores inculcados. Pero en especial quiero agradecer a mi madre por acompañarme, darme fuerzas en cada momento para seguir adelante, por su cariño, amor y sobre todo por ser un excelente ejemplo de vida a seguir.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, mi segundo hogar, gracias por los conocimientos adquiridos y por permitirme crecer como profesional.

A quienes forman parte de la Industria Farmacéutica Ginsberg S.A. Quito, gracias por el apoyo, los conocimientos brindados día tras día y la confianza depositada en mí para desarrollar mi proyecto de tesis.

Al Dr. Carlos Espinoza y a la Dra. Ana Albuja por su excelente colaboración en el desarrollo de mi tesis, cuya ayuda, enseñanza y consejos han sido de gran importancia para culminar con éxito mi carrera profesional.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: **“VALIDACIÓN DE LA PRUEBA DE ESTERILIDAD MEDIANTE LA TÉCNICA DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA Y DETERMINACIÓN DE PIRÓGENOS EN EL PRODUCTO FARMACEÚTICO INYECTABLE -INTRAVIT® 10.000 BLISPACK- DE LA EMPRESA GINSBERG ECUADOR S.A.”**, de responsabilidad de la señorita egresada Martha Gimena Barrera Orellana, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Ing.César Ávalos
**DECANO FACULTAD
DE CIENCIAS**

Dra. Ana Albuja
**DIRECTORA DE ESCUELA
DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

Dr. Carlos Espinoza
DIRECTOR DE TESIS

Dra. Ana Albuja
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

**DIRECTOR CENTRO
DE DOCUMENTACIÓN**

NOTA DE TESIS ESCRITA _____

Yo, (Martha Gimena Barrera Orellana), soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

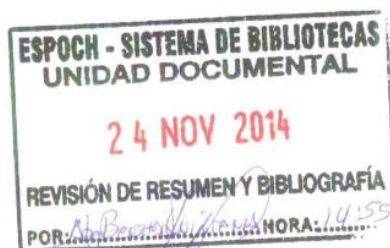
(Martha Gimena Barrera Orellana)

RESUMEN

Se realizó la validación de la prueba de esterilidad mediante la técnica de filtración por membrana y se determinó la presencia o ausencia de pirógenos en el producto farmacéutico inyectable Intravit 10.000 Blispack de la Empresa GINSBERG ECUADOR S.A. Estudio realizado en el Laboratorio de Microbiología, en el Departamento de Control de Calidad de la Empresa GINSBERG ECUADOR S.A. de la ciudad de Quito.

En el proceso de validación de la prueba de esterilidad se desarrolló ensayos que permitieron verificar: la esterilidad de los medios de cultivo utilizados y la promoción de crecimiento, en la cual, se utilizó 6 cepas de microorganismos *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium sporogenes*, *Bacillus subtilis spizizenili*, *Cándida albicans* y *Aspergillus brasiliensis*, prueba realizada con el propósito de comprobar que los medios de cultivo poseen las condiciones necesarias para el crecimiento de los microorganismos. Además, se desarrolló la prueba de fungistasis y bacteriostasis en la que se determinó la actividad bacteriostática y fungistática del producto farmacéutico y finalmente se realizó el método de filtración por membrana del inyectable, método que será utilizado como ensayo de rutina para el análisis de este medicamento. En la determinación de pirógenos se utilizó material despirogenado y reactivos en condiciones estrictas de almacenamiento, es decir, temperatura de 2°C-8°C. Se realizaron pruebas como: el ensayo UNSPIKE (Diluciones de producto sin adición de endotoxina bacteriana), ensayo SPIKE (Diluciones del producto con adición de endotoxina bacteriana) y la determinación de la dilución de trabajo, que corresponde a la dilución a la cual el medicamento no presenta ningún tipo de inhibición.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluye que la prueba de esterilidad, específicamente la técnica de filtración por membrana fue validada correctamente, permitiendo utilizar esta metodología en análisis posteriores del inyectable, la misma que, proporcionará resultados confiables. Además, el medicamento se encuentra libre de pirógenos. Por lo tanto, el producto farmacéutico se encuentra apto para ser comercializado y debidamente administrado, no causará ningún tipo de daño al paciente, cumpliendo con el efecto farmacológico esperado.

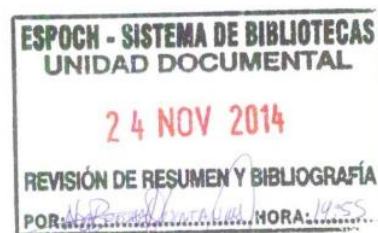


ABSTRACT

It is performed the validation test of sterility by membrane filtration technique and it was determined the presence or absence of pyrogens in the injectable pharmaceutical product: 10,000 Intravit BlisPack of the Company GINSBERG ECUADOR SA. Study conducted at the Laboratory of Microbiology, Department of Quality Control of the Company GINSBERG ECUADOR SA from the city of Quito.

In the process of validation of the test for sterility were developed essays that allowed check the sterility of the culture media used and the promotion of growth, in which 6 strains of microorganisms were used: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium sporogenes*, *Bacillus subtilis spizizenili*, *Candida albicans* and *Aspergillus brasiliensis*, test performed in order to verify that the culture media have the necessary conditions for the growth of microorganisms. In addition, it developed, test fungistasis and bacteriostasis in which it was determined; bacteriostatic and fungistatic activity of the pharmaceutical product and finally the filtration method was performed by injection membrane, which method will be used as a routine assay for the analysis of this drug. In determining of pyrogens, It was used; depyrogenated materials and reagents, stringent storage conditions, that is, 2 ° C-8 ° C. Tests were performed as: the test UNSPIKE (product dilutions without addition of bacterial endotoxin), SPIKE test (Product dilutions added bacterial endotoxin) and determination of the working dilution, which corresponds to the dilution at which the drug does not present any inhibition.

According to the results, we conclude that the test for sterility, specifically membrane filtration technique was validated properly, allowing to use this methodology in subsequent analyzes of injectable, the same that will provide reliable results. Also, the drug is pyrogen-free. Therefore, the pharmaceutical is suitable to be marketed and administered properly, it will not cause any harm to the patient, fulfilling the expected pharmacological effect.



ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE GRÁFICOS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

ÍNDICE DE ANEXOS

CAPÍTULO I	1
1 MARCO TEÓRICO	1
1.1 INFORMACIÓN DE LA EMPRESA	1
1.2 VALIDACIÓN	4
1.2.1 DOCUMENTACIÓN DE UNA VALIDACIÓN	5
1.2.2 BENEFICIOS DE REALIZAR VALIDACIONES	5
1.2.3 TIPOS DE VALIDACIÓN	6
1.2.4 CATEGORÍAS PARA VALIDAR PROCEDIMIENTOS	7
1.2.5 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN	9
1.2.6 VALIDACIONES MICROBIOLÓGICAS	10
1.2.6.1 Métodos cualitativos	12
1.2.6.2 Métodos cuantitativos	12
1.2.6.3 Métodos Semi-cuantitativos	12
1.2.6.4 Otros métodos	12
1.2.7 VALIDACIÓN DE PRUEBAS DE ESTERILIDAD	13
1.2.7.1 Esterilidad	13
1.2.7.2 Medios de cultivo	14

1.2.7.3	Esterilidad de los medios de cultivo	16
1.2.7.4	Promoción de crecimiento	16
1.2.7.5	Fungistasis y bacteriostasis	17
1.2.7.6	Métodos utilizados en la prueba de esterilidad	18
1.3	DETERMINACIÓN DE PIRÓGENOS.....	22
1.3.1	PIRÓGENOS.....	22
1.3.2	FUENTES DE PIRÓGENOS.....	23
1.3.3	MÉTODOS PARA DETERMINAR PIRÓGENOS.....	23
1.3.3.1	Prueba de Lisado de Amebocitos de <i>Limulus</i> (LAL).	24
1.3.3.2	Método GEL CLOT	24
1.3.3.3	Sensibilidad del rótulo del reactivo	25
1.3.3.4	Máxima dilución válida (MVD).....	25
1.3.3.5	Ensayo preliminares SPIKE y UNSPIKE.....	25
1.3.3.6	Interferencias de la técnica de LAL	27
1.4	SOLUCIONES INYECTABLES	28
1.4.1	INTRAVIT® 10.000 BLISPACK	29
CAPÍTULO II		31
2	PARTE EXPERIMENTAL.....	31
2.1	LUGAR DE PRUEBAS DE ENSAYO	31
2.2	FACTORES DE ESTUDIO	31
2.2.1	MUESTREO.....	31
2.3	MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS	32
2.3.1	MATERIALES BIOLÓGICOS.....	32
2.3.2	EQUIPOS	33
2.3.3	MATERIALES DE LABORATORIO	38
2.3.4	REACTIVOS.....	40
2.4	TÉCNICAS	44

2.4.1	MUESTREO DEL PRODUCTO	44
2.4.1.1	Número de réplicas para los ensayos.....	44
2.4.2	VALIDACIÓN DE LA PRUEBA DE ESTERILIDAD	45
2.4.2.1	Rehidratación de Cepas de Microorganismos.....	45
2.4.2.2	Esterilidad de los medios	46
2.4.2.3	Promoción de crecimiento	46
2.4.2.4	Fungistasis y Bacteriostasis	46
2.4.2.5	Técnica de filtración por membrana.....	47
2.4.3	DETERMINACIÓN DE PIRÓGENOS.....	48
2.4.3.1	Preparación del vial CSE	48
2.4.3.2	Preparación de LAL	48
2.4.3.3	Realización de la curva estándar	48
2.4.3.4	Cálculo del Máximo Valor de Dilución	50
2.4.3.5	Ensayo preliminares SPIKE y UNSPIKE.....	51
2.4.3.6	Ensayo de rutina.....	58
2.4.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	59
CAPÍTULO III.....		60
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
3.1	ESTERILIDAD	60
3.1.1	PRUEBA DE ESTERILIDAD	60
3.1.2	PRUEBA DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO.....	61
3.1.3	PRUEBA DE FUNGISTASIS Y BACTERIOSTASIS PARA <i>S. aureus</i>, <i>C. sporogenes</i> y <i>B. subtilis</i>.....	63
3.1.4	PRUEBA DE FUNGISTASIS Y BACTERIOSTASIS PARA <i>P. aeruginosa</i>, <i>C. albicans</i> y <i>A. brasiliensis</i>.....	63
3.1.5	VALIDACIÓN DEL PRODUCTO	64
3.2	DETERMINACIÓN DE PIRÓGENOS.....	65

3.2.1	CURVA ESTÁNDAR	65
3.2.2	CÁLCULO DEL MÁXIMO VALOR DE DILUCIÓN (MVD)	66
3.2.3	ENSAYO UNSPIKE (Diluciones de producto sin adición de endotoxina bacteriana)	67
3.2.4	ENSAYO SPIKE (Diluciones del producto con adición de endotoxina bacteriana)	69
3.2.5	SELECCIÓN DE LA DILUCIÓN DE TRABAJO	71
3.2.6	PRUEBA DE RUTINA	71
	CAPÍTULO IV	73
4	CONCLUSIONES	73
	CAPÍTULO V	75
5	RECOMENDACIONES	75
	BIBLIOGRAFÍA	77
	ANEXOS.....	81

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

BPL	Buenas Prácticas de Laboratorio
BPM:	Buenas Prácticas de Manufactura
FDA:	Administración de drogas y alimentos
ISO:	Organización Internacional de Estandarización
INEN:	Instituto Ecuatoriano de Normalización
USP:	Farmacopea de los Estados Unidos
POE:	Procedimiento Operacional Estándar
TSB:	Caldo de Soya Tríptica
TSA:	Agar Soya Tríptica
SAB:	Sabouraud
CSE:	Control estándar de endotoxina
LAL:	<i>Limulus Amebocyte Lysate</i>
LRW:	Agua reactivo LAL
SD:	Desviación Estándar
CLOT:	Coágulo
EU:	Unidad de endotoxinas
PF:	Punto Final
MG:	Media geométrica
Log:	Logaritmo
pH:	Potencial de hidrógeno
mL:	Mililitro
Log:	Logaritmo
μl:	Microlitro
λ:	Lambda
R:	Réplica
HPLC:	Cromatografía Líquida de Alta Definición
UV:	Espectrometría Ultravioleta
IR:	Infrarrojo

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N° 1	Categorías de los métodos analíticos.....	8
TABLA N° 2	Composición del medio Tioglicolato (Fórmula aproximada por litro)	14
TABLA N° 3	Composición del medio TSB (Fórmula aproximada por litro)	15
TABLA N° 4	Cepas de microorganismos para la prueba promoción de crecimiento	17
TABLA N° 5	Ensayo UNSPIKE	26
TABLA N° 6	Ensayo SPIKE.....	26
TABLA N° 7	Rehidratación de cepas	45
TABLA N° 8	Sistema de diluciones cianocobalamina	52
TABLA N° 9	Sistema de diluciones piridoxina	55

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N° 1. Resultado de la prueba de esterilidad. Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.....	60
CUADRO N° 2 Resultado de la prueba de promoción de crecimiento. Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.	61
CUADRO N° 3. Resultados de la prueba de fungistasis y bacteriostasis para <i>s. aureus</i> , <i>c. sporogenes</i> y <i>b. subtilis</i> . Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.	63
CUADRO N° 4. Resultados de la prueba de fungistasis y bacteriostasis para <i>p. aeruginosa</i> , <i>c. albicans</i> y <i>a. brasiliensis</i> . Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.....	63
CUADRO N° 5. Resultados de la validación del producto farmacéutico intravit. Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.	64
CUADRO N° 6. Resultados de la curva estándar. Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.	65
CUADRO N° 7. Resultados de la sensibilidad del rótulo. Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.....	65
CUADRO N° 8. Resultados del ensayo UNSPIKE considerando el (MVD) superior sin ajuste de pH. Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.	67
CUADRO N° 9. Resultados del ensayo UNSPIKE considerando el (MVD) superior con ajuste de pH. Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.	67

CUADRO N° 10. Resultados del ensayo UNSPIKE considerando el (MVD) inferior sin ajuste de pH. Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.	68
CUADRO N° 11. Resultados del ensayo UNSPIKE considerando el (MVD) inferior sin ajuste de pH. Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.	68
CUADRO N° 12. Resultados del ensayo SPIKE considerando el (MVD) superior sin ajuste de pH. Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad Ginsberg Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.	69
CUADRO N° 13 Resultados del ensayo SPIKE considerando el (MVD) superior con ajuste de pH. Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad Ginsberg Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.	69
CUADRO N° 14. Resultados del ensayo SPIKE considerando el (MVD) inferior sin ajuste de pH. Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.	70
CUADRO N° 15. Resultados del ensayo SPIKE considerando el (MVD) inferior con ajuste de pH. Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.	70
CUADRO N° 16 Resultados de la prueba de rutina del producto farmacéutico Intravit. Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.	71

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO N° 1. Enyayo UNSPIKE cianocobalamina. Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.....	53
GRÁFICO N° 2. Enyayo SPIKE cianocobalamina. Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.	54
GRÁFICO N° 3. Enyayo UNSPIKE piridoxina. Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.	56
GRÁFICO N° 4. Ensayo SPIKE piridoxina. Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.	57
GRÁFICO N° 5. Ensayo de rutina. Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.	58

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N° 1	Tioglicolato.....	14
FIGURA N° 2	TSB (Caldo de soya trípica)	15
FIGURA N° 3	Filtro de profundidad	19
FIGURA N° 4	Filtro de membrana	20
FIGURA N° 5	Filtro de nitrocelulosa	20
FIGURA N° 6	Filtro de acetato de celulosa	21
FIGURA N° 7	Equipo de filtración por membrana	22
FIGURA N° 8	<i>Limulus polyphemus</i>	24

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA N° 1.	Jeringa intravit 10.000 blispack. Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.....	29
FOTOGRAFÍA N° 2.	Etiqueta de Intravit 10.000 blispack. Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.....	32
FOTOGRAFÍA N° 3.	Etiqueta de calibración y mantenimiento de la balanza. Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.	34
FOTOGRAFÍA N° 4.	Etiqueta de calibración del baño maria termoblock. Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.	34
FOTOGRAFÍA N° 5.	Etiqueta de calibración de la estufa (hongos) Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.	35
FOTOGRAFÍA N° 6.	Etiqueta de calibración de la estufa (bacterias). Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.	35
FOTOGRAFÍA N° 7.	Etiqueta de calibración de la refrigeradora. Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.....	36
FOTOGRAFÍA N° 8.	Etiqueta de calibración del autoclave. Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.....	36
FOTOGRAFÍA N° 9.	Etiqueta de mantenimiento del microscopio. Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.	37
FOTOGRAFÍA N° 10.	Etiqueta de calificación operacional de la cabina de flujo laminar. Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.	37

FOTOGRAFÍA N° 11. Etiqueta de calibración del horno de despirogenación. Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.	38
FOTOGRAFÍA N° 12. Etiqueta de calibración y mantenimiento de la micropipeta de 1000 µl. Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.	39
FOTOGRAFÍA N° 13. Etiqueta de calibración y mantenimiento de la micropipeta de 100 µl. Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.	39
FOTOGRAFÍA N° 14. Etiqueta del reactivo LAL. Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.	42
FOTOGRAFÍA N° 15. Etiqueta del Control Standard Endotoxin (CSE). Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.	42
FOTOGRAFÍA N° 16. Etiqueta del LAL Reagent Water (LRW). Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.	43
FOTOGRAFIA N° 17. Tiras indicadoras de ph. Área de microbiología. Departamento de Control de Calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito. Agosto del 2014.	43

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N° 1	Especificaciones y método de análisis del intravit	81
ANEXO N° 2	Certificado de análisis de esterilidad	82
ANEXO N° 3	Certificado de análisis del ensayo de endotoxinas bacterianas LAL	83
ANEXO N° 4	Formato de protocolo de validación	84
ANEXO N° 5	Rehidratación de las cepas	87
ANEXO N° 6	Promoción de crecimiento	87
ANEXO N° 7	Fungistasis y bacteriostasis	88
ANEXO N° 8	Filtración por membrana.....	89
ANEXO N° 9	Reactivos LAL para la determinación de pirógenos	90
ANEXO N° 10	Regulación del pH	90
ANEXO N° 11	Ensayo de rutina	90
ANEXO N° 12	Incubación de las muestras	91
ANEXO N° 13	Lectura de resultados	91

INTRODUCCIÓN

Una industria farmacéutica actualmente es considerada como un sector de gran importancia dentro del ámbito de la salud, ya que, se dedica a la investigación, producción y distribución de una gran variedad de productos farmacéuticos, controlando su calidad con el propósito de que cada medicamento cumpla con el efecto farmacológico y así mejorar la salud de la humanidad y prevenir el desarrollo de enfermedades.

La calidad de cada producto farmacéutico se ve reflejada en las BPM (Buenas Prácticas de Manufactura) que se aplican, cuyo objetivo o finalidad es agrupar criterios y conocimientos destinados a la obtención de la excelencia y calidad de los productos en cada lote de medicamento que se produce.

Para cumplir con las BPM, las industrias farmacéuticas utilizan equipos de alta tecnología, infraestructura adecuada para cada actividad y proceso que se llevará a cabo dentro de la industria, personal altamente calificado y con amplia experiencia y metodologías que garanticen un correcto y adecuado control de cada análisis realizado.

Por tal motivo, se ponen en práctica procesos de validación, los mismos que, establecen evidencias documentadas de cada método aplicado en el análisis de los productos farmacéuticos, permitiéndonos tener un alto grado de confianza en los resultados obtenidos. Se desarrolla protocolos de calidad los mismos que para su utilización son previamente revisados y controlados por organismos de vigilancia tanto nacionales como internacionales.

Para obtener un buen nivel de calidad mediante la aplicación de un proceso de validación, es necesario el cumplimiento estricto de cada parámetro de calidad establecido en cada etapa de producción de un medicamento, demostrando con evidencias que el método analítico aplicado en el análisis es el adecuado.

De esta manera, se establecen diferentes técnicas tanto de elaboración como de análisis para cada producto farmacéutico dependiendo de las características físicas, químicas y microbiológicas que cada una de ellas posee dependiendo además de su forma farmacéutica.

Debido a esto, un inyectable es considerado un fármaco que presenta un proceso de manufactura y análisis que se debe realizar con un alto grado de esterilidad evitando cualquier tipo de contaminación que pudiera causar no solo daños en la estabilidad o vida útil del producto sino también en la salud de quién se administre este medicamento.

Por lo tanto, el análisis microbiológico de todo producto farmacéutico y en especial de inyectables resulta de gran importancia en cada etapa de su producción desde la materia prima hasta el producto terminado con el fin de garantizar la calidad y permitir su comercialización.

Como consecuencia de esto, en este trabajo de tesis se desarrolló la validación de la prueba de esterilidad mediante la técnica de filtración por membrana y se determinó la presencia de pirógenos en el producto farmacéutico inyectable “INTRAVIT® 10.000 BLISPACK” de la Empresa GINSBERG ECUADOR S.A.

Esta tesis se llevó a cabo mediante la utilización de métodos establecidas por la USP Británica 35-NF 30, en la cual se encuentra descrito todos los parámetros de calidad que deben cumplir los productos farmacéuticos.

CAPÍTULO I

1 MARCO TEÓRICO

1.1 INFORMACIÓN DE LA EMPRESA

GINSBERG ECUADOR S.A.

La industria farmacéutica ecuatoriana GINSBERG S.A ubicada en la ciudad de Quito, se encarga de la elaboración de medicamentos de calidad y en diferentes formas farmacéuticas, ya que, cuenta con laboratorios especializados, con equipos de alta tecnología que permiten realizar análisis con resultados confiables. Además cuenta con profesionales altamente capacitados y responsables que saben defenderse y poner en alto el área o departamento en el cual se desempeñan.¹

GINSBERG S.A. se rige a políticas y reglamentos de seguridad que tienen como principal objetivo velar por la salud y bienestar de sus empleados. Además cumple rigurosamente con certificaciones y normas como: NTE INEN, Farmacopea, USP y BPM que permiten obtener productos seguros y de calidad.¹

Esta industria farmacéutica se encuentra conformada especialmente por dos áreas importantes para la elaboración de medicamentos: producción y aseguramiento de la calidad, el trabajo en conjunto de estas áreas permiten obtener productos garantizados y sumamente confiables.¹

¹METODOLOGÍA INTERNA, GINSBERG S.A.

PRODUCCIÓN

Es el área encargada exclusivamente de la elaboración y fabricación de todos los medicamentos que son comercializados. Estos productos se encuentran en diferentes formas farmacéuticas como: jaleas, comprimidos, cápsulas, tabletas, cremas, sueros e inyectables.¹

ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

La función de este departamento consiste especialmente en controlar los parámetros de calidad y dar cumplimiento con las especificaciones propuestas por la USP, Farmacopea, ISO 9001 y BPM. De este departamento depende la aprobación del medicamento para su comercialización. Está dividida en las siguientes áreas:

- **Control de calidad:** Esta área se encuentra constituida de dos laboratorios, el primero el físico-químico, en el cuál, se efectúa los análisis respectivos para cada medicamento. Se analiza materias primas, producto semielaborado y producto terminado realizando valoraciones de cada uno ya sea por HPLC, UV o IR de acuerdo con los métodos establecidos por la USP y Farmacopea.¹

El segundo laboratorio es el Microbiológico el mismo que se encarga del análisis de materia prima, semielaborado, producto terminado, agua para inyectables y ambientes. Esta área establece mayor importancia en los productos estériles principalmente y demás productos controlando que no exista ningún tipo de contaminación microbiana que pudiera poner en peligro la salud del paciente así como la estabilidad del producto.¹

- **Documentación:** Es la encargada de controlar el cumplimiento de los Procedimientos Operativos Estandarizados (POES) en cada análisis o proceso efectuado.¹

¹METODOLOGÍA INTERNA, GINSBERG S.A.

- **Validaciones:** Área encargada de documentar y por lo tanto verificar el correcto funcionamiento de cada procedimiento y método utilizado en el departamento de control de calidad.

Se realizan validaciones de los procesos de limpieza, métodos de elaboración y de los productos ya elaborados validando cada principio activo del que están constituidos.

En una industria farmacéutica y especialmente en GINSBERG S.A. la validación de un método o procedimiento resulta ser uno de los requisitos principales, ya que se trata de una evidencia documentada que brinda un elevado grado de seguridad al momento de obtener resultados los mismos que serán exactos, es decir, con un bajo o casi nulo porcentaje de error y por lo tanto muy confiables.¹

El área de validaciones de la industria farmacéutica GINSBERG S.A. cumple con un cronograma anual para lo cual requiere de la colaboración indispensable de todas las áreas que conforman el departamento de Aseguramiento de la Calidad. Los resultados obtenidos son documentados, los mismos que cuentan con un alto grado de seguridad y confianza.¹

El Cronograma anual de validaciones incluye la validación de métodos analíticos, equipos ya sea estos nuevos o ya existentes en la planta de producción y de procesos incluyendo los de limpieza.¹

Esta área también se encarga de verificar las calibraciones de los equipos e instrumentos presentes en Control de Calidad y en la planta de producción.¹

¹METODOLOGÍA INTERNA, GINSBERG S.A.

1.2 VALIDACIÓN

La validación se basa principalmente en la ejecución de un proceso propuesto especialmente para la obtención de pruebas documentadas que certifican que un método de análisis es lo suficientemente seguro y confiable para producir resultados que se encuentren dentro de los rangos o especificaciones establecidas.²

Definición:

*“Procedimiento para establecer pruebas documentales que demuestren científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas”.*²

Una validación deberá realizarse siempre de forma obligatoria cuando se establece o se crea un nuevo método, ya que, permite asegurar que el procedimiento realizado es el correcto para un producto en específico.²

La validación de un método analítico se encuentra establecido mediante varios estudios de laboratorio que buscan confirmar que todos los parámetros establecidos en un método cumplan con los requisitos analíticos previstos.³

Por tal motivo, el principal objetivo de una validación es garantizar que el método o procedimiento analítico utilizado va a proporcionar resultados confiables que permitirán llegar al propósito deseado, por lo tanto, es necesario establecer y definir de forma apropiada todas las condiciones de trabajo para cada análisis realizado.⁴

En un proceso de validación se debe validar lo siguiente:

- **Métodos Analíticos:** Dentro del cual se analizan diferentes parámetros tales como: sensibilidad, linealidad, exactitud, etc.

² ARRIOLA, Lucrecia, 2012

³ ARIAS, J y CORTÉS, A, 2003

⁴ WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997

- **Sistemas Analíticos:** Se trata de una validación en conjunto, dentro de la cual se incluyen los instrumentos y equipos, el operador o analista y el método que se utiliza. Con la aplicación del método se concluye que todo en conjunto funcione como se espera.
- **Análisis de la muestra:** Consiste en evidenciar mediante documentación la comprobación de los datos primarios.⁵

1.2.1 DOCUMENTACIÓN DE UNA VALIDACIÓN

- **Protocolo:** En este documento consta la metodología que se deberá seguir durante el proceso de validación, se especificará todas las pruebas necesarias y puntos críticos que pudieran presentarse.⁵
- **Informe:** Resume todo el proceso de validación, además deberá incluirse los resultados, recomendaciones, observaciones y si fuera necesario se puede adicionar anexos dentro de los cuales están presentes los cromatogramas.⁵
- **Certificado:** Se emitirá una vez concluida la validación la misma que deberá estar aprobada.⁵
- **Status de validación:** Documento que será presentado cada año al Comité de Calidad para su respectiva evaluación.⁵
- **Etiqueta de validación:** Etiqueta que certifica el proceso de calibración del equipo.⁵

1.2.2 BENEFICIOS DE REALIZAR VALIDACIONES

- Se realiza especialmente para cumplir con los requisitos establecidos por las normas internacionales como: Buenas Prácticas de manufactura (BPM), ISO, USP, FAO y Farmacopea.⁶
- En el departamento de Aseguramiento de la Calidad dentro de una industria farmacéutica resulta importante por el motivo de que sin procesos validados es difícil obtener productos seguros y de calidad.⁶
- Proporciona rapidez y un alto grado de seguridad en la realización de pruebas analíticas así como en la obtención de sus resultados.⁶

⁵ USP 24, 2006

⁶ CECMED. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos, 1994.

- Permite optimizar procesos y reducir costos, ya que, se evitarán rechazos de productos por fallas en el control de la calidad.⁷
- Garantiza el funcionamiento uniforme de un proceso y por lo tanto su cumplimiento con las especificaciones.⁷
- En el caso de la validación de un equipo, se debe realizar específicamente al inicio, es decir, tras la compra o adquisición del mismo, con el objetivo de comprobar que el equipo cumpla con las especificaciones de compra y que por lo tanto su funcionamiento se encuentre dentro de las condiciones normales como lo especifica el fabricante.⁷
- Al realizar una validación se garantiza el funcionamiento correcto de un ensayo o metodología, ya que, este proceso de validación es aplicado principalmente cuando se trata de un método que va a ser utilizado por primera vez o cuando sea necesario implementar o incorporar mejoras en un método ya existente.⁷

1.2.3 TIPOS DE VALIDACIÓN

Las validaciones pueden ser clasificadas tomando en cuenta el momento en la cual se realiza. Por lo tanto se divide en:

- **Prospectiva:** Es aquella que se efectúa cuando se trata de un producto nuevo el cual involucra durante su desarrollo una fase experimental, se lleva a cabo antes de la fabricación. Este tipo de validación también es aplicada cuando se trata de un proceso nuevo o cuando se ha efectuado cambios en el proceso de elaboración que pudieran afectar al producto.⁸
- **Concurrente:** Se trata del tipo de validación que se efectúa durante un proceso común. Permite determinar que el método aplicado es el adecuado y que está cumpliendo con el propósito para el cual se utiliza.⁸

⁷ SOSO, Ariel, et al. 1998

⁸ REYES, Rodrigo, 2001.

Esta validación debe ser ejecutada específicamente para controlar los tres primeros lotes de una producción. La efectividad de este método se basa en que los aspectos críticos hayan sido analizados en la etapa de desarrollo, es decir, durante la validación prospectiva.⁸

- **Retrospectiva:** Establece evidencias documentadas de un proceso o método para analizar su idoneidad mediante la verificación y evaluación de datos acumulados con anterioridad. Su efectividad se sustenta en que las condiciones y características tanto del producto, método y equipo no hayan sufrido ningún cambio que pudieran afectar en la evaluación de los resultados. Esto se realiza con la finalidad de determinar si el análisis realizado se encuentra dentro de los límites y especificaciones permitidas.⁸
- **Revalidación:** Es importante para determinar variaciones que afecten la calidad del producto, ya sea que estas hayan sido introducidas de forma intencional o erróneo. Se clasifica en dos categorías:
 1. **Revalidación en caso de cambios:** Es aplicada cuando se haya efectuado algún tipo de cambio que pudiera afectar las características de un producto. El cambio puede estar presente en materias primas, material envase-empaque, equipos, métodos de análisis y procedimientos para su elaboración.⁸
 2. **Revalidación periódica:** Es utilizada incluso en el caso de que no se presenten cambios intencionales, ya que, las variaciones pueden introducirse durante un proceso, en el cuál, el equipo al momento de encontrarse en uso puede producir dichos cambios a pesar de que operadores experimentados lo estén manipulando.⁸

1.2.4 CATEGORÍAS PARA VALIDAR PROCEDIMIENTOS

Estas categorías son establecidas por la USP y proporcionan características de validación diferentes para cada método en particular.

⁸ REYES, Rodrigo, 2001.

CATEGORÍA I: Son pruebas cuantitativas que permiten determinar el contenido de principio activo en productos farmacéuticos terminados.⁹

CATEGORÍA II: Prueba cuantitativa o cualitativa utilizada para establecer la presencia de impurezas en una muestra y así verificar si su valor se encuentra dentro de los rangos especificados.⁹

CATEGORÍA III: En esta categoría se incluyen las pruebas físico-químicas que son propias de un fármaco. Ejemplo: disolución, liberación del principio activo del fármaco, etc.⁹

CATEGORIA IV: Esta categoría encierra todos aquellos análisis de identificación de un analito, cuyo propósito es determinar la presencia o ausencia del mismo. (Tabla 1).

TABLA Nº 1 CATEGORÍAS DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Analytical Performance Characteristics to Measure vs. Type of Method					
Analytical Performance Parameter	Category 1: Assays	Category 2: Impurities		Category 3: Specific Tests	Category 4: Identification
		Quantitative	Limit Tests		
Accuracy	Yes	Yes	*	*	No
Precision	Yes	Yes	No	Yes	No
Specificity	Yes	Yes	Yes	*	Yes
LOD	No	No	Yes	*	No
LLOQ	No	Yes	No	*	No
Linearity	Yes	Yes	No	*	No
Range	Yes	Yes	No	*	No
Robustness	Yes	Yes	No	Yes	No

Source: Data from [12].
 Note: *May be required, depending upon type of test. For example, although dissolution testing falls into category 3, as a quantitative test, measurements typical of category 1 are used (with some exceptions).

FUENTE: USP 24, Capítulo 12.

⁹ USP 24, Capítulo 12.

1.2.5 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

La principal función de los parámetros de validación es permitir evaluar el rendimiento de un método. Son los siguientes:

- Exactitud
- Precisión
- Especificidad
- Límite de detección
- Límite de Cuantificación
- Linealidad
- Intervalo
- Robustez

EXACTITUD: Se refiere a la proximidad que existe entre los resultados, es decir, la cercanía entre el valor obtenido con el real. En el caso de la valoración de un producto farmacéutico, la exactitud se realiza mediante un proceso analítico y frente a un estándar de referencia. Para calcular su valor se realiza la diferencia entre los dos datos, el obtenido durante la aplicación del método analítico y el valor verdadero.²

PRESICIÓN: Consiste en determinar el grado de concordancia que existe entre los resultados, cuando estos pertenecen a varios muestreos provenientes de una misma muestra homogénea. La precisión se encuentra expresada como la desviación estándar relativa y está conformada por dos medidas: la repetitividad y la reproducibilidad.²

ESPECIFICIDAD: Parámetro utilizado para evaluar un analito en presencia de impurezas y productos de degradación. Durante la valoración de un fármaco para la demostración de la especificidad esta se consigue mediante la agregación de excipientes o impurezas en cantidades conocidas con el fin de comprobar que el resultado obtenido y el procedimiento utilizado no se ven afectados por la presencia de los mismos.²

²ARRIOLA, Lucrecia, 2012

LÍMITE DE DETECCIÓN: Permite determinar la concentración mínima de analito que se puede detectar aunque no cuantificar en un método de análisis de una muestra.²

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN: Este límite establece la mínima concentración a la que un analito resulta totalmente aceptable para los niveles o parámetros tanto de precisión como de exactitud.¹⁰

LINEALIDAD: Capacidad para obtener resultados los cuales deben ser proporcionales a la concentración del analito presente en la muestra, dicha proporcionalidad se obtendrá ya sea de forma directa o a través de la utilización de procedimientos matemáticos.⁷

INTERVALO: Es el parámetro que permite definir las concentraciones en la cuales resulta preciso la aplicación de un método, evitando la utilización de las muestras originales.⁷

ROBUSTEZ: Es la medida que permite determinar la capacidad que tiene un método analítico para no sufrir ningún efecto al encontrarse frente a variaciones mínimas, siendo estas las más habituales las que se presentan en el pH, temperatura, características de la fase móvil, etc.⁷

1.2.6 VALIDACIONES MICROBIOLÓGICAS

Las validaciones de métodos microbiológicos resultan de gran importancia al igual que las químicas, debido a que, en este laboratorio encontramos equipos, materiales y reactivos propios y característicos de un entorno microbiológico, los cuales, también requieren de la aplicación de las BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio). En el área microbiológica la variabilidad de los resultados es mayor, por tal motivo, es indispensable estandarizar todos los factores y parámetros que intervienen en la ejecución de algún análisis como: medios de cultivo, tiempos y temperaturas de incubación, etc.¹¹

¹⁰ UNODC. Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito, 2010

² ARRIOLA, Lucrecia, 2012

¹¹ ORTEGA AGUIRRE, Leticia et al. 2001.

⁷ SOSO, Ariel, et al. 1998

Además, como un punto principal se debe analizar y evaluar los criterios de repetición de un método de análisis cuando se haya obtenido algún resultado erróneo o incorrecto. Por lo tanto, se debe tomar en cuenta:

- El tiempo estimado para la obtención de resultados en un análisis microbiológico es mucho mayor que en un análisis químico, ya que, en esta área se habla de días y no de horas.
- Los procesos de repetición casi siempre conducen a resultados distintos.
- En el caso de una prueba de esterilidad la repetición es permitida solo en el caso de que se presente un resultado falso positivo, es decir, que se demuestre que el laboratorio fue el responsable de dicho error.¹¹

Por consiguiente, los procesos de validación al ser aplicados a los métodos de análisis garantizaran la obtención de resultados con un alto grado de confianza y de seguridad y así evitar la presencia de falsos positivos y de igual manera se evitará realizar repeticiones.¹¹

En una validación microbiológica es importante:

- Incluir en cada prueba realizada un control negativo en el que no se inocula microorganismos con el fin de evaluar la contaminación por parte del laboratorio y no de la prueba.
- Realizar controles positivos y negativos y analizar visualmente los crecimientos. Un control positivo debe presentar crecimiento ya que en ella se ha incluido un inóculo de microorganismos, en cambio, un control negativo no debe presentar crecimiento.
- Realizar toda la documentación del proceso de validación realizada.¹¹

Los parámetros de validación más comúnmente utilizados para métodos microbiológicos son: la exactitud y la precisión, debido a que, los límites aplicados o utilizados son más amplios.

¹¹ORTEGA AGUIRRE, Leticia et al. 2001.

En cuanto a los demás parámetros, la selectividad requiere de un proceso de demostración, ya que, se utilizan medios de cultivo selectivos que permiten identificar claramente al microorganismo con el cual se trabaja. ¹¹

La validación de métodos microbiológicos es diferente y se pueden clasificar en:

1.2.6.1 Métodos cualitativos

Aquellos en los que se pretende detectar la existencia o ausencia de un microorganismo determinado claramente y especificado en una porción de sustancia (muestra).¹²

1.2.6.2 Métodos cuantitativos.

Aquellos en los que se desea indicar el número de unidades formadoras de colonias en una cantidad de sustancia, realizando un recuento concreto, cuantificar la concentración de anticuerpos específicos, de ácidos nucleicos (por ejemplo, carga viral, etc.). Su objetivo es detectar un valor numérico de un agente infeccioso en una muestra. ¹²

1.2.6.3 Métodos Semi-cuantitativos

Aquellos en los que se indica el número de microorganismos en una cantidad de muestra determinada, teniendo en cuenta la estadística, como por ejemplo el Método del NMP (Número Más Probable).¹²

1.2.6.4 Otros métodos

Algunos autores destacan los métodos de identificación, que en realidad son métodos cualitativos donde lo que interesa es la positividad o negatividad de una o varias pruebas. Los métodos de estudio de sensibilidad se pueden considerar como métodos cuantitativos en base a que el resultado es numérico en el caso de la concentración mínima inhibitoria.

¹²CAMARÓ, María y otros. 2013

¹¹ORTEGA AGUIRRE, Leticia et al. 2001.

Igualmente se debe evaluar cuidadosamente los criterios de repetición de un ensayo cuando un primer análisis ha sido incorrecto ya que los análisis microbiológicos necesitan más tiempo que los químicos para obtener resultados. En conclusión la obtención de resultados confiables y seguros va a depender de la correcta aplicación de la metodología y todo el desarrollo del proceso.¹³

1.2.7 VALIDACIÓN DE PRUEBAS DE ESTERILIDAD

1.2.7.1 Esterilidad

El término esterilidad se define como la ausencia total de microorganismos viables capaces de multiplicarse en un producto. La esterilidad es el parámetro que debe ser analizado de forma obligatoria en un producto farmacéutico parenteral.¹⁴

En una industria farmacéutica, esta prueba busca determinar la presencia de contaminantes que estarían en la capacidad de producir daños en la salud del paciente como procesos infecciosos. Se fundamenta principalmente en analizar el medicamento tomando una parte de este o en su totalidad para ser inoculado en un medio de cultivo estéril para así determinar la presencia o ausencia de microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) mediante la formación de turbidez.¹⁴

Para verificar que los medios de cultivo contienen las propiedades nutritivas óptimas para el desarrollo de microorganismos, se realizan pruebas utilizando cepas puras de bacterias, hongos y levaduras exigentes desde el punto de vista tanto para las necesidades nutritivas como para supervivencia en condiciones aerobias y anaerobias.¹⁴

La prueba de esterilidad debe realizarse cumpliendo estrictamente las condiciones propuestas por las BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio), utilizando material completamente estéril y el análisis deberá realizarse en la cabina de flujo laminar, disminuyendo al máximo la posibilidad de que se produjera un crecimiento microbiano por causa de una contaminación externa.¹⁴

¹³ <http://www.catlab.com.ar/notas.php?idm=1408&accion1=notas&PHPSESSID=f1b21309ce96e5d4b326c93398d>

¹⁴ARIAS, Jorge, 2005.

Los parámetros utilizados y analizados para realizar la prueba de esterilidad son los siguientes:

1.2.7.2 Medios de cultivo

Los principales medios de cultivo utilizados para la ejecución de la prueba de esterilidad según la USP 35-NF 30 son:

- **MEDIO DE FLUIDO TIOGLICOLATO**

Medio de cultivo que permite el crecimiento de bacterias anaerobias principalmente, pero también permite el crecimiento de ciertas bacterias aerobias. Su composición es la siguiente¹⁵:

TABLA N° 2 COMPOSICIÓN DEL MEDIO (Fórmula aproximada por litro)

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
Digerido pancreático de caseína	15,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Dextrosa	5,5 g
Cloruro de sodio	2,5 g
L-Cistina	0,5 g
Tioglicolato de sodio	0,5 g
Agar	0,75 g
Resazurina	0,001 g

Fuente: GALEANO, Norma. Microbiología Industrial. Bogotá.: 2007. 16, 17, 18 p.



FIGURA N° 1 TIOGLICOLATO

¹⁵GALEANO, Norma, 2007

Los componentes responsables de crear un ambiente anaeróbico son la L-Cistina y el Tioglicolato de sodio. Además, la elevada viscosidad que este medio presenta hace que el oxígeno no pueda ingresar, creando así el medio óptimo para el crecimiento y desarrollo de bacterias anaerobias evidenciando su presencia mediante la turbidez del medio.

Este medio debe ser incubado a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ durante 14 días después de adicionarle el inóculo del producto que se va a analizar.¹⁵

- **TSB (Caldo de soya tríptica)**

Es utilizado principalmente para el crecimiento de hongos y levaduras, aunque además permite el desarrollo de ciertas bacterias aerobias. Es considerado un medio muy nutritivo debido a los componentes que posee, ya que, favorece el crecimiento de una gran variedad de microorganismos.¹⁵ Sus componentes son los siguientes:

TABLA Nº 3 COMPOSICIÓN DEL MEDIO (Fórmula aproximada por litro)

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
Digerido pancreático de caseína	17,0 g
Digerido papaínico de soja	3,0 g
Dextrosa	2,5 g
Cloruro sódico	5,0 g
Fosfato di potásico	2,5 g

Fuente: GALEANO, Norma. Microbiología Industrial. Bogotá.: 2007. 16, 17, 18 p.



FIGURA Nº 2 TSB (Caldo de soya tríptica)

¹⁵GALEANO, Norma, 2007

Las principales sustancias nutritivas del medio son el digerido pancreático de caseína y papaínico de soja los cuales son considerados como aminoácidos y sustancias nutritivas que permiten el óptimo crecimiento de varios microorganismos. Este medio después de la inoculación con el producto debe ser incubado a $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ durante 14 días.¹⁶

1.2.7.3 Esterilidad de los medios de cultivo

Esta prueba se realiza con la finalidad de verificar la esterilidad total de los medios de cultivo que serán utilizados durante la validación, por lo tanto, para determinar la presencia o ausencia de microorganismos se debe incubar durante 14 días una porción del medio ya preparado y estéril. La temperatura de incubación dependerá de las características del medio.¹⁶

1.2.7.4 Promoción de crecimiento

Consiste en determinar la efectividad de los medios de cultivo utilizados, es decir, verificar que cada medio contenga los nutrientes necesarios y en buen estado para permitir el crecimiento microbiano ya sea de bacterias, hongos o levaduras.¹⁷

Para la ejecución de esta prueba se utilizan cepas puras de microorganismos los cuales serán inoculados en cada medio por duplicado en una cantidad de no más de 100 UFC por medio e incubados tomando en cuenta las características tanto del medio como del microorganismo (Tabla 4).

La prueba resultará satisfactoria si luego del transcurso de 7 días se observa turbidez en todos los medios y por lo tanto podrán ser utilizados para análisis posteriores.¹⁷

¹⁶USP 35-NF 30. Métodos Microbiológicos. Chapter 10.Volumen No. 29(3).

¹⁷HUGO, W. RUSSEL, A. 1998.

TABLA N 4 CEPAS DE MICROORGANISMOS PARA LA PRUEBA DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO.

MEDIO DE CULTIVO	MICROORGANISMO	CEPA	TEMPERATURA DE INCUBACIÓN
TIOGLICOLATO	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	ATCC: 9027	37°C ±0,5
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC: 6538	37°C ±0,5
	<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC: 19404	37°C ±0,5
	<i>Bacillus subtilis spizizenili</i>	ATCC: 6633	37°C ±0,5
TSB (Caldo de soya trípica)	<i>Cándida albicans</i>	ATCC: 10231	25°C ± 0,5
	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC: 16404	25°C ± 0,5

Fuente: HUGO, W. RUSSEL, A. Microbiología Farmacéutica. Gran Bretaña: Sexta Edición. Blackwell Science. 1998. 19-23, 310-322 p.

1.2.7.5 Fungistasis y bacteriostasis

La prueba de fungistasis y bacteriostasis permite realizar ensayos con el propósito de asegurar que el producto farmacéutico no posee ninguna propiedad antimicrobiana que pudiera inhibir el crecimiento de microorganismos contaminantes.¹⁸

Se fundamenta básicamente en filtrar una porción del producto, seguido de un lavado con un diluyente apropiado y por último filtrar una cantidad de entre 10 y 100 microorganismos viables presentes en una dilución 10^6 anteriormente realizada. El número de colonias formadas luego del proceso de incubación es comparado con un control positivo el cual contiene una única filtración con la dilución de microorganismos.¹⁸

La prueba es satisfactoria si se evidencia un crecimiento con un número de colonias similar o igual al del control positivo. Esta prueba es solo realizada cuando se trata del método de filtración por membrana.¹⁸

Tipos de diluyentes utilizados:

- **Diluyente A:** Contiene pectona en concentración de 1 gramo por litro de agua, es utilizado básicamente para lavar líquidos miscibles en agua.

¹⁸NEIRA, D. 2004

- **Diluyente D:** Además de pectona contiene Tween 80 en una cantidad de 1 gramo por litro de agua. Este diluyente se usa en el caso de que el producto farmacéutico líquido sea oleoso o inmisible en agua.
- **Diluyente K:** Esta formado de pectona, tween 80 y extracto de carne bovina, es usado cuando se analiza productos que contienen sustancias derivadas del petróleo como el petrolato.¹⁹

1.2.7.6 Métodos utilizados en la prueba de esterilidad

1. INOCULACIÓN DIRECTA

Su procedimiento consiste en inocular directamente el producto farmacéutico en los medios de cultivo utilizando un volumen de producto que sea considerado como una muestra representativa y que además el medio debe contener el volumen suficiente para promover el crecimiento del microorganismo.²⁰

2. FILTRACIÓN POR MEMBRANA

Es el método más utilizado y recomendado por las USP y Farmacopeas para realizar la prueba de filtración por membrana en productos farmacéuticos parenterales.²⁰

Para su ejecución se utiliza filtros elaborados a base de acetato y nitrato de celulosa con un tamaño del poro de 0,45 µm o 0,22 µm y un diámetro del disco de 50 mm.²⁰

2.1. Tipos de filtros de membrana

Filtros de profundidad

Se encuentran elaborados a base de material fibroso como papel, fibra de vidrio o asbesto.

¹⁹REMINGTON, A. 2003

²⁰AVENDAÑO, J. y MOYANO, E. 1997

Cualquiera de estos elementos crea varias vías dentro de las cuales quedará retenido cualquier contaminante que se encuentre presente en la muestra filtrada.²¹

Su uso permite obtener varias ventajas como permitir la filtración de grandes volúmenes y retener varias partículas sobre su superficie. Sin embargo, presenta una desventaja que al momento de realizar un análisis puede ser el causante de un cierto porcentaje de error, la desventaja radica en que este tipo de filtro presenta poros de diferente tamaño, por lo tanto, existe la posibilidad de liberación de partículas y microorganismos hacia el material filtrado.²¹

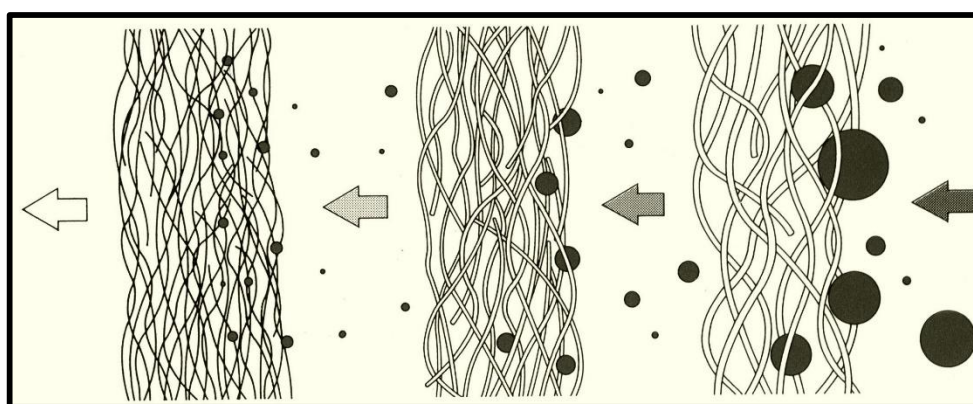


FIGURA Nº 3 FILTRO DE PROFUNDIDAD

Filtros de superficie o de membrana

Son filtros elaborados a base de nitrato de celulosa y acetato de celulosa, la composición de estos materiales permiten obtener poros de tamaño uniforme.²¹

Al conocer el tamaño de los poros podemos seleccionar el filtro que se va a utilizar con el fin de retener las partículas o microorganismos en su totalidad, siendo esta una gran ventaja al momento de realizar un análisis.²¹

Sin embargo, se pueden saturar muy rápido y por lo tanto la velocidad de filtrado puede disminuir volviéndose lenta en pocos instantes.²¹

²¹ PEARCE, G. 2007.

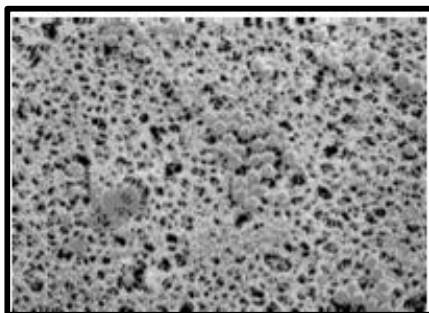


FIGURA Nº 4 FILTRO DE MEMBRANA

- **Membranas de Nitrocelulosa**

Son membranas de naturaleza hidrofílica con microestructura y tamaño de poros muy uniforme, lo que permite asegurar una excelente retención de partículas y microorganismos. Esta característica representa una gran ventaja para ser utilizado en pruebas microbiológicas, ya que, permite un óptimo crecimiento de bacterias, hongos y levaduras en el análisis de muestras de agua, bebidas y fármacos especialmente productos farmacéuticos parenterales.²¹



FIGURA Nº 5 FILTRO DE NITROCELULOSA

- **Membranas de Acetato de Celulosa**

Son filtros de naturaleza hidrofílica, con un bajo nivel de absorción y una excelente estabilidad térmica por lo que son utilizados especialmente en la esterilización de soluciones biológicas. Además presenta altas velocidades de flujo resultando apropiado en el uso de soluciones acuosas, alcohólicas y oleosas.²¹

²¹ PEARCE, G. 2007.

Existen filtros con una gran variedad de tamaños de poros como: 0.20, 0.45, 0.65 y 0.80 μ m, por lo tanto, dependiendo del tamaño del poro ciertas partículas de mayor tamaño quedarán retenidas en la superficie y partículas pequeñas pasarán a través de la membrana al sitio de filtrado.²¹

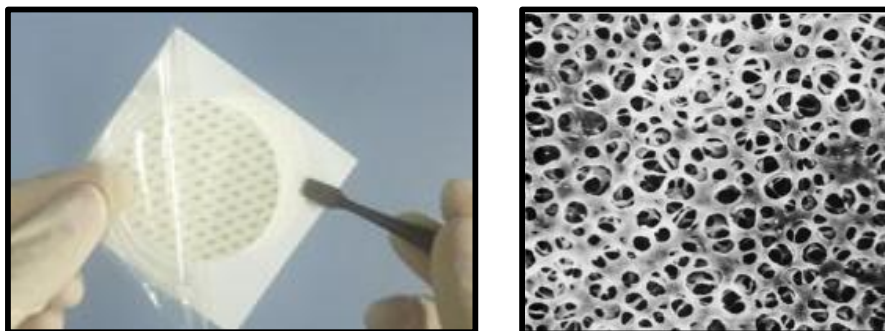


FIGURA N° 6 FILTRO DE ACETATO DE CELULOSA

2.2.Utilización de los filtros de membrana

El fundamento del uso de estos filtros consiste en que los microorganismos no pueden atravesarlos debido al microscópico tamaño del poro y por lo tanto ya sea bacterias u hongos quedarán en la superficie. Este filtro al ser depositado en un medio de cultivo (Tioglicolato y TSB) promoverá al desarrollo y crecimiento de los microorganismos que se evidenciará después de haber transcurrido 14 días de estar incubado a la temperatura adecuada.²¹

El equipo que se utiliza para realizar la filtración consta de: un embudo estéril en el cual se deposita el filtro ayudándonos de una pinza, además está constituido de mangueras, kitasatos y un equipo conocido con el nombre de Manifold de Poliacetal de 3 plazas utilizado para colocar los embudos.²¹

²¹PEARCE, G. 2007.



FIGURA Nº 7 EQUIPO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA

Existen dos sistemas de filtración por membrana: el abierto y el cerrado. La principal diferencia entre los dos es que en el sistema cerrado no existe manipulación ni de la membrana ni de la muestra, mientras que en el abierto necesariamente se debe abrir el sistema para adicionar la muestra y colocar la membrana y en este punto es en donde puede existir alguna contaminación externa.²⁰

Para realizar la filtración tanto por un sistema como por el otro se trabaja bajo un ambiente estéril en una cabina de flujo laminar.²⁰

1.3 DETERMINACIÓN DE PIRÓGENOS

1.3.1 PIRÓGENOS

Fue en 1923 fecha en la cual se utilizó por primera vez el término “sustancias pirogénicas” expresada por Siebert quien utilizó dicho término para nombrar a estas sustancias como responsables de las reacciones febriles.²²

Los pirógenos son sustancias que se producen como resultado del metabolismo y crecimiento bacteriano, e incluso pueden formarse como producto de la muerte de las mismas bacterias.²²

Al ingresar al organismo tanto de humanos como de animales producen elevación en la temperatura corporal generando una reacción febril o hipotermia.²²

²²AVENDAÑO, J. y MOYANO, E. 1997

²⁰ZIMMER, A y SPIES, .1999.

Gran cantidad de microorganismos ya sea bacterias, hongos y levaduras tienen la capacidad de producir pirógenos siendo las endotoxinas bacterianas las más comunes, las cuales provienen de las bacterias Gram negativas.²³

Producen varios efectos farmacológicos los cuales son evidentes a pocos minutos después de administrar el inyectable por vía intravenosa, el efecto más evidente es la reacción febril, la misma que está acompañada de dolor de cabeza, escalofríos, vómito y trastornos gastrointestinales.²³

1.3.2 FUENTES DE PIRÓGENOS

Los pirógenos provienen del metabolismo bacteriano y por lo tanto pueden originarse en cualquier sitio en donde estos microorganismos estén presentes, son más comunes en productos farmacéuticos parenterales y su contaminación se puede efectuar en cada etapa de su producción.²⁴

El medio de contaminación más común es:

1. El agua utilizada como solvente para el inyectable. Al ser el agua un medio pobre con escasos nutrientes, los microorganismos son transportados a través del aire y el polvo, por tal motivo, se debe usar exclusivamente agua estéril y libre de pirógenos.²⁴
2. Los envases, empaques, materiales utilizados durante la elaboración del inyectable.
3. Las drogas utilizadas para las soluciones, especialmente si se trata de drogas que se cristalizan ya que en este proceso los pirógenos son absorbidos.²⁴

1.3.3 MÉTODOS PARA DETERMINAR PIRÓGENOS

La USP establece que los métodos utilizados para determinar pirógenos son: reacción térmica en conejos y la prueba de Lisado de Amebocitos de *Limulus* (LAL), siendo esta la más utilizada actualmente.²⁴

²²ZIMMER, A y SPIES, .1999.

²³HELMAN, J. 1987.

²⁴TURCO, S. y KING, M. 1974

1.3.3.1 Prueba de Lisado de Amebocitos de *Limulus* (LAL).

Prueba utilizada para determinar pirógenos en especial endotoxinas bacterianas que son las más comunes.

Esta prueba consiste en utilizar un extracto acuoso de las células sanguíneas de un cangrejo de herradura conocido con el nombre de (*Limulus polyphemus*) para cuantificar la cantidad de endotoxinas presentes en el producto que se va a analizar.²⁵



FIGURA Nº 8 *Limulus polyphemus*

Dicha prueba se fundamenta en la formación de un coágulo como resultado de la interacción que existe entre la endotoxina con los amebocitos lo que permite que se produzca una serie de reacciones en cascada llevando a la formación de un gel fuertemente firme y claramente visible.²⁵

Los principales organismos internacionales promueven la utilización del método LAL como principal requisito para comercializar productos farmacéuticos parenterales, exigiendo que el contenido de las endotoxinas bacterianas se encuentre por debajo de los límites establecidos por la FDA (Food and Drug Administration).²⁵

1.3.3.2 Método GEL CLOT

Método cualitativo utilizado para determinar endotoxinas, en la cual, la endotoxina produce un gran número de reacciones enzimáticas. La cadena de reacciones finaliza cuando se forma una única enzima coagulante activada.

²⁵http://www.acciusa.com/pdfs/accProduct/Pyrochrome_multilang_IFUs/PyrochromeIFU_PN0_es_r1.pdf

La cantidad y firmeza del coagulo formado va a depender de la concentración de endotoxinas presente en la muestra que se analiza.²⁶

1.3.3.3 Sensibilidad del rótulo del reactivo

Ensayo utilizado para verificar que no exista ningún tipo de variación en el rótulo del reactivo. Para cumplir con esta prueba se debe realizar diluciones por cuádruplicado del CSE (Control Estándar de Endotoxinas), las cuales, llevaran la codificación de 2λ , λ , $\lambda/2$, $\lambda/4$, en este caso, λ significa la sensibilidad marcada del reactivo LAL, expresada en UE/mL (Unidades de Endotoxinas por mililitro). A estas diluciones se le agrega el reactivo LAL, se incuba y se lee los resultados.²⁶

1.3.3.4 Máxima dilución válida (MVD)

Se realiza a un producto para determinar la máxima dilución a la cual aún se puede detectar endotoxinas mediante la utilización del método LAL. Par determinar dicho valor, se realiza cálculos en los cuales se toma en cuenta el límite de endotoxina establecido por la USP y que es permitido para el producto que se va a analizar, este valor se multiplica por la concentración de la muestra y dividido para la sensibilidad de LAL²⁶. La fórmula que se aplica es la siguiente:

$$\text{MDV} = \frac{(\text{Límite de endotoxina UE/mL} \times \text{Concentración de la muestra})}{\text{Sensibilidad de LAL}}$$

1.3.3.5 Ensayo preliminares SPIKE y UNSPIKE

En este ensayo se realizan 9 diluciones en los dos casos y de acuerdo al cálculo ejecutado para determinar la MVD, esta prueba es utilizada con la finalidad de demostrar si hasta la dilución calculada se puede detectar endotoxinas o si existe alguna inhibición durante el proceso de detección.²⁵

²⁶BURGUET, Nancy y BRITO, Lázaro César. 2012

²⁵http://www.acciusa.com/pdfs/accProduct/Pyrochrome_multilang_IFUs/PyrochromeIFU_PN0_es_r1.pdf

La diferencia entre una y otra prueba es la cantidad de producto utilizado y los reactivos que cada disolución emplea. Los siguientes cuadros establecen las condiciones de cada ensayo.²⁵

TABLA Nº 5 ENSAYO UNSPIKE

1	2 (1:2)	3 (1:4)	4 (1:8)	5 (1:16)	6 (1:32)	7 (1:64)	8 (1:80)	9 C-
200µl producto	100µl Agua apirógena	100µl Agua apirógena	100µl Agua apirógena	100µl Agua apirógena	100µl Agua apirógena	100µl Agua apirógena	100µl Producto diluido	100µl Agua apirógena
100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL

Fuente: BURGUET, Nancy y BRITO, Lázaro César. Validación del método LAL para determinar endotoxinas bacterianas en el inyectable heparina sódica. Buenos Aires. Argentina: Vaccimonitor. 2012. 1-5 p.

TABLA Nº 6 ENSAYO SPIKE

1	2 (1:2)	3 (1:4)	4 (1:8)	5 (1:16)	6 (1:32)	7 (1:64)	8 (1:80)	9 C-
190µl Producto + 10µl Endo 10UE/ml	100µl Endo 0.5 UE/ml	100µl Endo 0.5 UE/ml	100µl Endo 0.5 UE/ml	100µl Endo 0.5 UE/ml	100µl Endo 0.5 UE/ml	100µl Endo 0.5 UE/ml	190µl Producto diluido + 10µl Endo 10UE/ml	100µl Agua apirógena
100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL	100µl LAL

Fuente: BURGUET, Nancy y BRITO, Lázaro César. Validación del método LAL para determinar endotoxinas bacterianas en el inyectable heparina sódica. Buenos Aires. Argentina: Vaccimonitor. 2012. 1-5 p.

De la prueba SPIKE se determina la dilución de trabajo, la misma, que será útil para cada ensayo de rutina empleada para el inyectable analizado. La dilución determinada será por lo menos 2 veces mayor a la dilución en la cual ya se presenció la formación de gel.²⁶

Una vez obtenida la dilución de trabajo, se realiza el análisis del producto farmacéutico para determinar la presencia o ausencia de endotoxinas bacterias.

²⁵http://www.acciusa.com/pdfs/accProduct/Pyrochrome_multilang_IFUs/PyrochromeIFU_PN0_es_r1.pdf

²⁶BURGUET, Nancy y BRITO, Lázaro César. 2012

1.3.3.6 Interferencias de la técnica de LAL

Normalmente la técnica de LAL se interfiere principalmente por la muestra que se analiza.²⁷ Existen tres tipos de interferencias:

1. INHIBICIÓN:

Se debe realizar un ensayo previo de la muestra para verificar la ausencia de cualquier tipo de inhibición. Existen varios factores que pueden influenciar de manera negativa en los resultados del análisis, obteniéndose así falsos positivos, estos factores son:

- **pH:** Debido a que la prueba LAL acepta pH cercanos a la neutralización, es decir, entre 6 y 8.
- **Cationes divalentes:** No debe existir la presencia de estos cationes, ya que, neutralizan la carga negativa de las endotoxinas y como consecuencia de esto disminuyen su actividad.
- **Excipientes:** Ciertos excipientes presentes en los fármacos pueden inhibir la acción de esta prueba.
- **Agentes quelantes:** Como Heparina, EDTA, etc. Estos agentes tienen la capacidad de enlazar cationes divalentes.
- **Material de vidrio:** En los que no debe existir restos de NaOH que son capaces de inhibir la formación del coágulo.²⁷

2. POTENCIACIÓN:

Interferencia que permite detectar una gran cantidad de endotoxinas presentes en la muestra muy diferente al valor real existente.²⁷

Para verificar si existe o no un incremento de la sensibilidad del reactivo LAL se debe adicionar una cantidad de CSE (Concentración de endotoxina estándar) a una muestra que se conoce que está libre de endotoxinas y a la misma muestra se deberá determinar la cantidad de endotoxinas presentes mediante el ensayo de LAL.²⁷

²⁷ COOPER, J. 1991.

Si la cantidad de endotoxinas determinada mediante el ensayo resulta ser mayor a la cantidad de endotoxinas conocida, entonces, se llega a la conclusión de que existe una potenciación.²⁷

3. FALSOS POSITIVOS:

Existen sustancias capaces de producir falsos positivos como la tripsina y los glicanos que activan a LAL y que dan la apariencia de que en realidad existen endotoxinas cuando no es así. Por lo tanto, es importante conocer el proceso de fabricación del producto y su naturaleza.²⁷

1.4 SOLUCIONES INYECTABLES

Son productos farmacéuticos que se pueden presentar como soluciones, suspensiones y emulsiones los cuales están preparados en condiciones estériles, es decir, sin la presencia de microorganismos contaminantes que pudieran afectar la salud del paciente.²⁸

Las soluciones inyectables pueden contener en su formulación uno o varios principios activos con uno o varios excipientes. Dichos componentes se pueden encontrar disueltos en agua o en medios no acuosos e incluso en dos o más disolventes los mismos que son miscibles entre sí.²⁸

Estos productos son envasados en recipientes adecuados y estériles ya que son soluciones que ingresarán al organismo por vía parenteral (intravenosa, intramuscular y subcutánea).²⁸

²⁷COOPER, J. 1991.

²⁸BURGUET, Nancy y BRITO, Lázaro César. 2012

1.4.1 INTRAVIT® 10.000 BLISPACK

Cada jeringa pre llena con 2 mL contiene:

- Tiamina (Vit. B1) 100.0 mg
- Piridoxina (Vit. B6) 100.0 mg
- Cianocobalamina (Vit. B12) 10.0 mg
- Excipientes c.s. Contiene Lidocaína HCL



FOTOGRAFÍA Nº 1 JERINGA INTRAVIT 10.000 BLISPACK. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.

TIAMINA (Vit. B1): Vitamina hidrosoluble que forma parte de las vitaminas que se encuentran presentes o incluidas en las del grupo B. Al igual que las demás vitaminas esta cumple con funciones vitales como la de proporcionar energía al organismo mediante una reacción que permite convertir los carbohidratos ingeridos en ATP. ²⁹

PIRIDOXINA (Vit. B6): Es otra vitamina hidrosoluble que ayuda a fortalecer el sistema inmunológico gracias a la formación de anticuerpos durante el proceso de síntesis de las proteínas. Además interfiere en la síntesis de lípidos y carbohidratos y en la formación de glóbulos rojos. ²⁹

CIANOCOBALAMINA (Vit. B12): Esta vitamina tiene funciones esenciales e importantes para el buen funcionamiento del organismo, ya que, ayuda con la formación del ADN y a cumplir con las actividades específicas de cada enzima. Además tiene función neurológica y permite que los eritrocitos cumplan con su proceso de maduración. ³⁰

²⁹<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/002401.htm>

³⁰<http://www.cun.es/enfermedades-tratamientos/medicamentos/cianocobalamina>

INTRAVIT® 10.000 BLISPACK está recomendado para una gran variedad de trastornos dolorosos como: neuralgias, síndrome cervical, polineuropatía alcohólica, neuropatía diabética, afecciones degenerativas del raquis y neuritis de amputación. Tiene efecto analgésico.³⁰

Vía de administración: Intramuscular preferible intraglutánea.

Dosificación:

Si el caso es grave se recomienda administrarse 1 jeringa de Intravit cada día y si el caso es leve es recomendable 2 o 3 jeringas por semana. Esto se realizará hasta que los síntomas desaparezcan.³⁰

Contraindicaciones: Si presenta reacciones alérgicas a cualquier componente de la solución inyectable.³⁰

Reacciones adversas: Se presenta de forma local en el área de la aplicación, en la cual, se puede producir enrojecimiento, prurito, hinchazón, y dolor. Estos síntomas se presentan en caso de existir hipersensibilidad o pueden también manifestarse varias horas después de la aplicación.

No debe ser administrado en mujeres embarazadas ni en período de lactancia.³⁰

³⁰<http://www.cun.es/enfermedades-tratamientos/medicamentos/Cianocobalamina>

CAPÍTULO II

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 LUGAR DE PRUEBAS DE ENSAYO

La presente investigación se realizó en la empresa GINSBERG ECUADOR S.A. de la ciudad de Quito, en el Laboratorio de Microbiología del departamento de Aseguramiento de la Calidad.

2.2 FACTORES DE ESTUDIO

El factor de estudio considerado para esta investigación fue la Validación de la prueba de esterilidad mediante la técnica de filtración por membrana y la determinación de pirógenos.

2.2.1 MUESTREO

Para la validación de la prueba de esterilidad la muestra utilizada fue la solución inyectable “Intravit® 10.000 Blispack”, seleccionada al azar, tomando muestras provenientes de un mismo lote y correspondientes al inicio, mitad y final de una producción.

Para la determinación de endotoxinas las muestras serán seleccionadas de la misma manera al azar pero estas solo corresponderán a la etapa final de la producción del medicamento.

2.3 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

Para el desarrollo de esta investigación se utilizó el área estéril del laboratorio de microbiología, con el fin de evitar cualquier tipo de contaminación que pudiera interferir de manera negativa y errónea los resultados.

Todos los equipos que intervinieron de forma directa en dicha investigación deben estar previamente calibrados y cada material utilizado debe estar esterilizado y despirogenado de acuerdo con su uso.

2.3.1 MATERIALES BIOLÓGICOS

Muestras de Intravit® 10.000 Blispack

- Solución Inyectable Intramuscular
- Cada jeringa prellenada por 2mL contiene:

Tiamina (Vit. B1) 100.0 mg

Piridoxina (Vit. B6) 100.0 mg

Cianocobalamina (Vit. B12) 10.0 mg

Excipientes c.s. Contiene Lidocaína HCL

- LOTE: 14665
- FECHA DE ELABORACIÓN: 2014-07
- Reg. San.: 6240-MAN-06-12



FOTOGRAFÍA N° 2. ETIQUETA DE INTRAVIT 10.000 BLISPACK. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.

Cepas puras de microorganismos

- Importador-Distribuidor: MEDIBAC 1991
- Temperatura de almacenamiento: 2°C-8°C
- Microorganismos Liofilizados:
 - *Pseudomona aeruginosa*
ATCC: 9027
 - *Staphylococcus aureus*
ATCC: 6538
 - *Clostridium sporogenes*
ATCC: 19404
 - *Bacillus subtilis spizizenili*
ATCC: 6633
 - *Cándida albicans*
ATCC: 10231
 - *Aspergillus brasiliensis*
ATCC: 16404

2.3.2 EQUIPOS

Balanza

- Modelo: Adventurer Pro AV812
- Marca: Ohaus
- Peso máximo: 810g
- Serie: 8027031201
- Fecha de revisión: 10 de marzo del 2014



FOTOGRAFÍA N° 3. ETIQUETA DE CALIBRACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LA BALANZA. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.

Baño maria TERMOBLOCK

- Modelo: SH-1002
- Marca: DRY BATH
- Capacidad: 40 muestras por corrida
- Serie: N-AS-SH2-112
- Fecha Calibración: 24 de abril del 2014.
- Vigencia 2 años.



FOTOGRAFÍA N° 4. ETIQUETA DE CALIBRACIÓN DEL BAÑO MARIA TERMOBLOCK ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.

Agitador mecánico VORTEX Touch GLAS-COL

- Modelo: Glas-Col Terre Haute
- Marca: TOUCH VORTEXER
- Serie: N. 398824
- Fecha Calibración: 24 diciembre 2012
- Vigencia 2 años
- Condiciones: 1AMP 120 VOLTS

Estufa (Hongos)

- Modelo: Beschickung – Loading 100-800
- Marca: Memmert
- Temperatura: 25°C
- Serie: E507.0780
- Fecha de revisión: abril 2014
- Fecha de calibración: 22 de abril del 2014



FOTOGRAFÍA N° 5. ETIQUETA DE CALIBRACIÓN DE LA ESTUFA (HONGOS) ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.

Estufa (Bacterias)

- Modelo: Beschickung – Loading 100-800
- Marca: Memmert
- Temperatura: 37°C
- Serie: E507.0781
- Fecha de revisión: abril 2014
- Fecha de calibración: 21 de abril del 2014



FOTOGRAFÍA N° 6. ETIQUETA DE CALIBRACIÓN DE LA ESTUFA (BACTERIAS). ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.

Refrigeradora

- Modelo: ERDW093MSJG
- Marca: Electrolux
- Consumo de energía: 186.28 (KWh/año)
- Fecha de calibración: 24 de abril del 2014



FOTOGRAFÍA N° 7. ETIQUETA DE CALIBRACIÓN DE LA REFRIGERADORA. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.

Autoclave

- Marca: Tuttnauex 3870E
- Serie: 2606665
- Fecha de revisión: abril 2014
- Fecha de calibración: 23 de abril del 2014



FOTOGRAFÍA N° 8. ETIQUETA DE CALIBRACIÓN DEL AUTOCLAVE. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.

Microscopio


- Modelo: CX31RBSFA
- Marca: Olympus CX31
- Serie: 7108634
- Fecha de Mantenimiento: noviembre 2013

CALIBRACION <input type="checkbox"/>		Resp. <i>Diana Cuñas</i>
MANTENIMIENTO <input checked="" type="checkbox"/>		
Fecha:	nov-2013	
Próxima:	nov-2014	
Quito-Ecuador Telf: 593-998572003 dcalibracion@gmail.com		Servicio Técnico Autorizado
		

FOTOGRAFÍA N° 9. ETIQUETA DE MANTENIMIENTO DEL MICROSCOPIO. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.

Cabina de Flujo Laminar

- Modelo: Purifier Class II Biosafety Cabinet
- Marca: LABCONCO
- Serie: 070267297
- Fecha de calibración: 12 Noviembre 2013
- Equipo calificado por: ELICROM

	CALIFICACIÓN
INSTALACIÓN: <input type="checkbox"/> OPERACIONAL: <input checked="" type="checkbox"/> DESEMPEÑO: <input type="checkbox"/>	
EQUIPO / CÓDIGO: <i>CABINA DE SEGURIDAD BIOLÓGICA / LAB-034</i>	
MARCA: <i>LABCONCO</i>	MODELO: <i>CLASE II</i>
SERIE: <i>070267297</i>	ÁREA: <i>SIEMBRA</i>
FECHA: <i>12- Nov- 2013</i>	VIGENCIA: <i>NOV- 2014</i>
REALIZADO POR: <i>d. Ruiz</i>	

FOTOGRAFÍA N° 10. ETIQUETA DE CALIFICACIÓN OPERACIONAL DE LA CABINA DE FLUJO LAMINAR. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.

Equipo de Filtración por membrana

- Modelo: WP6111560
- Marca: MILLIPORE
- Serie: M600108

Horno de despirogenación

- Modelo: Beschickung – Loading 100-800
- Marca: Memmert
- Temperatura: 220°C
- Serie: C505.1126
- Fecha de revisión: abril 2014
- Fecha de calibración: 22 de abril del 2014



FOTOGRAFÍA N° 11. ETIQUETA DE CALIBRACIÓN DEL HORNO DE DESPIROGENACIÓN. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.

2.3.3 MATERIALES DE LABORATORIO

Los materiales de laboratorio utilizados para la validación de la prueba de filtración por membrana fueron previamente esterilizados. La esterilización se llevó a cabo en el autoclave.

Este equipo utiliza vapor de agua saturada alcanzando una temperatura de 121°C y el proceso de esterilización se lleva a cabo en un tiempo de 15 minutos.

Para la determinación de pirógenos se utilizó materiales despirogenados, es decir, que se encuentren libres de endotoxinas. Todos los materiales de vidrio que fueron utilizados recibieron un tratamiento previo de despirogenación, dicho proceso se realizó en el horno de despirogenación, el mismo que utiliza calor seco a temperatura de 220°C por un lapso de tiempo de 3 horas. La despirogenación de los materiales se realizó el mismo día del análisis.

Los materiales de laboratorio utilizados fueron los siguientes:

Micropipeta 1000 μ L

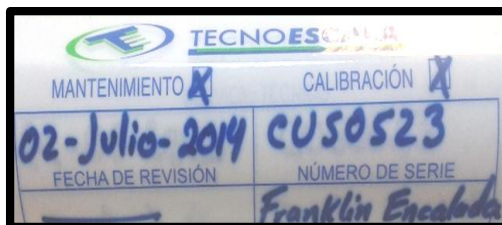
- Marca: BOECO Germany
- Serie: 12514851
- Volumen máximo: 1000 μ L
- Fecha de Revisión: 03 de abril del 2014



FOTOGRAFÍA N° 12. ETIQUETA DE CALIBRACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LA MICROPIPETA DE 1000 μ L. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.

Micropipeta 100 μ L

- Marca: BOECO Germany
- Serie: CU50523
- Volumen máximo: 100 μ L
- Fecha de Revisión: 02 de julio del 2014



FOTOGRAFÍA N° 13. ETIQUETA DE CALIBRACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LA MICROPIPETA DE 100 μ L. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.

Filtros de membrana de 0,22µm

- Modelo: ME 24/21 ST
- Marca: GE Healthcare Life Sciences Whatman
- Dimensiones: Poros de 0,22 µm y de 47mm de diámetro
- Made in Germany

Tubos despirogenados

- Marca: Endosafe
- Código de producto: T200 Package of 50
- Dimensión: 10mm x 75mm
- Uso: Tubos despirogenados de vidrio utilizados para procesos de validación.

Pipetas despirogenadas

- Marca: BOECO Germany
- Volumen: 100-1000µL
- Usos: Utilizado en determinaciones de DNA, RNA, PCR y ensayos de LAL.

Gradilla

- Marca: BOECO Germany
- Especificaciones: Gradilla plástico 25x10x7 cm, capacidad 60.

2.3.4 REACTIVOS

MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS:

TSB (Caldo de soya tríptica)

- Marca: BD DIFCO
- Presentación: 500g
- Lote: 1153875
- Código Fabricante: 211825

Tioglicolato

- Marca: BD DIFCO
- Presentación: 500g
- Lote: 0130887
- Código Fabricante: 225650

TSA (Agar de soya tríptica)

- Marca: BD DIFCO
- Presentación: 500g
- Lote: 4069059
- Código Fabricante: 211043

Sabouraud

- Marca: BD DIFCO
- Presentación: 500g
- Lote: 4083287
- Código Fabricante: 210950

Pectona

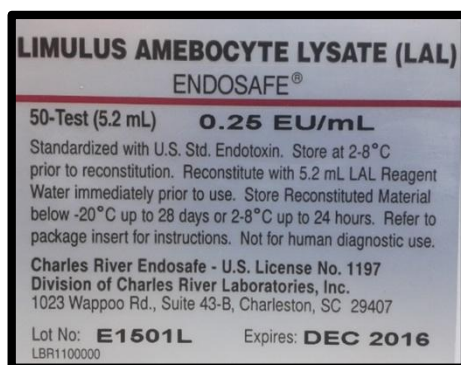
- Marca: BD DIFCO
- Presentación: 500g
- Lote: 4093224
- Código Fabricante: 211677

REACTIVOS DE LAL

Reactivo *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL)

- Marca: ENDOSAFE

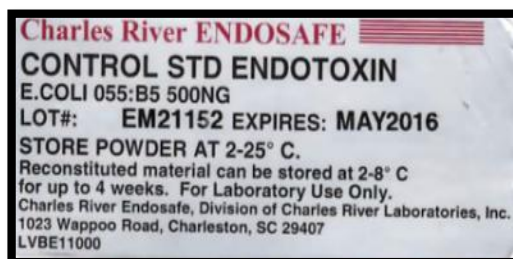
- Sensibilidad: 0.25 EU/mL
- Lote: E1501L
- Presentación. Polvo para reconstituir con 5.2 mL de agua libre de pirógenos.
- Temperatura de conservación: 2-8°C
- Fecha de Expiración: 2016/12



FOTOGRAFÍA N° 14. ETIQUETA DEL REACTIVO LAL, ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.

Endotoxin (*Escherichia coli*) Control Standard Endotoxin (CSE)

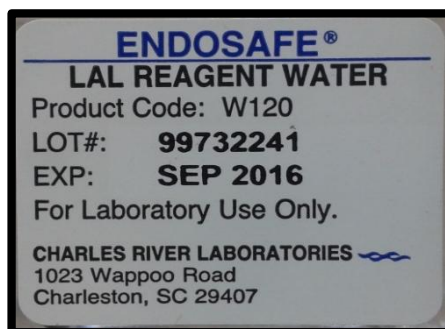
- Marca: ENDOSAFE
- Estándar de referencia de Endotoxinas RSE (Reference Standard Endotoxin) de la USP: Estándar Control *E. coli* 005:B5 500NG
- Lote: EM21152
- Temperatura de conservación: 2-8°C
- Fecha de Expiración: 2016/12



FOTOGRAFÍA N° 15. ETIQUETA DEL CONTROL STANDARD ENDOTOXIN (CSE). ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.

LAL Reagent Water (LRW): Agua libre de pirógenos

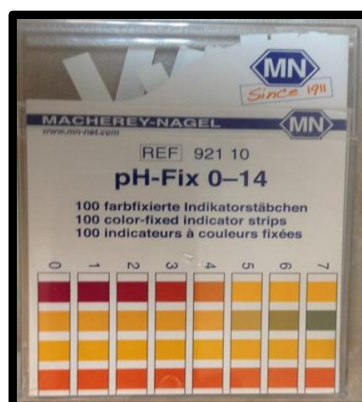
- Marca: ENDOSAFE
- Código de Producto: W120
- Lote: 99732241
- Fecha de Expiración: 2016/09



**FOTOGRAFÍA N° 16. ETIQUETA DEL LAL REAGENT WATER (LRW).
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE
CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A.
QUITO. AGOSTO DEL 2014.**

Tiras indicadoras de pH

- Marca MERCK
- Lote: 1384728
- pH-Fix: 0-14
- Cantidad: 100 tiras indicadoras



**FOTOGRAFIA N° 17. TIRAS INDICADORAS DE PH. ÁREA DE
MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE
CONTROL DE CALIDAD GINSBERG
ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.**

2.4 TÉCNICAS

2.4.1 MUESTREO DEL PRODUCTO

Las muestras del producto inyectable Intravit 10.000 Blispack para la validación fueron tomadas al azar cogiendo muestras representativas de un lote correspondiente al inicio, mitad y a la etapa final de una misma producción.

En el caso de la determinación de pirógenos, se realizó un muestreo de la misma manera, es decir, al azar pero en este caso solo se tomará las muestras de un solo lote y especialmente de la etapa final de la producción.

2.4.1.1 Número de réplicas para los ensayos.

El número de réplicas realizadas en los diferentes ensayos tanto para la validación como para la determinación de pirógenos fueron tomadas de metodologías establecidas en la USP 35-NF 30.

PRUEBA BACTERIOSTASIS Y FUNGISTASIS

Se realizaron 5 réplicas de cada muestra, cada una de estas con su respectivo control positivo y negativo. Estas repeticiones se realizaron con el fin de comprobar en cada repetición la presencia de colonias de los 6 microorganismos utilizados.

DETERMINACIÓN DE PIRÓGENOS

Todos los ensayos establecidos en esta prueba se realizaron por duplicado, con el propósito de confirmar los resultados obtenidos al finalizar la determinación.

2.4.2 VALIDACIÓN DE LA PRUEBA DE ESTERILIDAD

2.4.2.1 Rehidratación de Cepas de Microorganismos

Método que consiste en rehidratar el liofilizado de cepas puras ATCC y mantenerlas en condiciones ideales de: medio de crecimiento y temperatura, para su conservación.

1. Sacar el frasco en el cual se encuentran los microorganismos, el mismo que debe estar almacenado (+/-) 4 °C, y dejar que el frasco alcance temperatura ambiente dentro de la cámara de bioseguridad.
2. Abrir el frasco con la mayor asepsia posible y con ayuda de la aguja esterilizada al fuego tomar una de las pastillas (fragmentos) de gelatina del frasco. Colocar la pastilla en 0,5ml de caldo de soja tríptico (TSB). Volver a sellar inmediatamente el frasco con el sobrante, utilizando un tapón de goma y la tapa rosca. Volver a almacenar el frasco con las pastillas sobrantes a una temperatura de 2 a 8°C.
3. Mezclar bien y transferir un inóculo de la mezcla en un tubo que contiene 10 mL de agar inclinado de Sabouraud y agar TSA, cada microorganismo será sembrado mediante el método de estriado en el agar correspondiente para su crecimiento de acuerdo con la TABLA N°7.
4. Incuba a la temperatura y tiempo indicados.

TABLA N° 7 REHIDRATACIÓN DE CEPAS

MICROORGANISMOS	CEPA	MEDIO DE CULTIVO	TEMPERATURA	TIEMPO
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	ATCC: 9027	TSA	37°C ±0,5	24-48 horas
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC: 6538	TSA	37°C ±0,5	24-48 horas
<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC: 19404	TSA	37°C ±0,5	24-48 horas
<i>Bacillus subtilis spizizenili</i>	ATCC: 6633	TSA	25°C ± 0,5	24-48 horas
<i>Cándida albicans</i>	ATCC: 10231	SAB	25°C ± 0,5	5-7 días
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC: 16404	SAB	25°C ± 0,5	5-7 días

Fuente: Metodología Interna Ginsberg

2.4.2.2 Esterilidad de los medios

Esta prueba es realizada con el objetivo de determinar y verificar la esterilidad de los medios, es decir, que estén libres de microorganismos que puedan interferir en el resultado final.

Consiste en preparar los medios de Tioglicolato y TSB e incubarlos a la temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ y $37^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ respectivamente durante 14 días. Luego del transcurso de este tiempo se observa los resultados, la presencia de turbidez en los medios significa que este no se encuentra estéril pero si no existe turbidez entonces el resultado de la prueba es satisfactorio.

2.4.2.3 Promoción de crecimiento

Su objetivo es comprobar que los diferentes medios de cultivo utilizados en el laboratorio cumplen con las características de crecimiento y recuperación de diferentes microorganismos a través de la promoción de medios de cultivo. Su procedimiento es el siguiente:

1. Realizar suspensiones de cada cepa de microorganismos hasta obtener un índice de Mac-Farland 3, el mismo que contiene una cantidad de 9×10^8 UFC/mL.
2. De esta suspensión realizar diluciones hasta la dilución 10^6 .
3. De cada dilución de los microorganismos tomar 0,1 mL y sembrar en los respectivos medios que se desea probar, en este caso Tioglicolato y TSB.
4. Finalmente incubar los medios a las temperaturas respectivas $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ y $37^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}$ y observar los resultados después de 14 días.
5. La presencia de turbidez en los medios indica que existe crecimiento y por lo tanto la prueba es satisfactoria.

2.4.2.4 Fungistasis y Bacteriostasis

Esta prueba permite determinar si el medicamento analizado presenta actividad antibacteriana impidiendo que los microorganismos se desarrollen.

El procedimiento es el siguiente:

1. Realizar una suspensión de cada microorganismo hasta obtener un índice Mac-Farland 3 y de esta hacer diluciones hasta llegar a la dilución 10^6 .
2. En el equipo de filtración y con la utilización de un filtro $0,22\ \mu\text{m}$, efectuar una filtración de 100 mL de producto.
3. Luego lavar dos veces la membrana con un diluyente apropiado, en este caso el diluyente A (peatona 1g/L). Utilizar en cada lavado 100mL del diluyente.
4. Posteriormente se realiza un tercer lavado con 0,1mL de la dilución 10^6 del microorganismo.
5. Tomar el filtro con una pinza estéril y colocarla en el medio de cultivo correspondiente para cada microorganismo (TABLA N°7).
6. Realizar un control positivo con tres lavados, dos del diluyente y una de la dilución 10^6 , sin utilizar en este caso el producto.
7. Este procedimiento es ejecutado de forma individual para cada microorganismo.
8. Finalmente incubar los agares a la temperatura correspondiente y durante 7 días.
9. Observar los resultados mediante la visualización de colonias formadas comparándolas con el control positivo.

2.4.2.5 Técnica de filtración por membrana

Permite determinar la esterilidad del producto farmacéutico inyectable mediante la utilización de un equipo de filtración.

1. Previa la realización de la prueba de esterilidad colocar las muestras de los inyectables de INTRAVIT en un vaso que contiene alcohol al 70%, dejar ahí el producto durante 30 minutos.
2. Luego de este tiempo preparar el equipo de filtración y todos los materiales que se vayan a utilizar dentro de la cámara de flujo laminar y dejar durante 15 minutos todo el equipo en luz UV.
3. Una vez transcurrido el tiempo, realizar la filtración del producto utilizando filtros de $0,22\ \mu\text{m}$, un filtro para cada medio de cultivo, para hongos TSB y para bacterias Tioglicolato. En cada filtración utilizar 100mL de producto puro.

4. Incubar los medios no menos de 14 días.
5. La prueba de esterilidad será satisfactoria sí: a la temperatura indicada en cada caso aerobios totales 37°C y para Hongos y levaduras 25°C y después de 14 días de incubación no se produce crecimiento de ningún microorganismo.

2.4.3 DETERMINACIÓN DE PIRÓGENOS

2.4.3.1 Preparación del vial CSE

1. Retirar la protección de metal que contiene el frasco de CSE (Control estándar de endotoxina) y depositar 5 mL de LRW (Agua reactivo LAL).
2. Mezclar en el vortex durante 1 minuto y luego dejar reposar el frasco por 10 minutos a temperatura ambiente.

2.4.3.2 Preparación de LAL

1. Reconstituir el vial añadiendo 5,2 mL de LRW.
2. Mezclar el reactivo sin agitar hasta que se forme una solución homogénea y dejar reposar completamente hasta que se vuelva de color transparente.

2.4.3.3 Realización de la curva estándar

La concentración inicial del CSE es de 1000 UE y se requiere llevar a distintas concentraciones para lo cual se realiza el siguiente procedimiento con la utilización de material despirogenado, en este proceso se realizaron cuatro réplicas:

1. Para llevar a una concentración de 100 UE

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$100 \text{ UE (2000}\mu\text{L)} = 1000 \text{ UE (V}_2\text{)}$$

$$200 \mu\text{L} = V_2$$

$$200 \mu\text{L CSE} + 1800 \mu\text{L H}_2\text{O} \longrightarrow \text{(T1)}$$

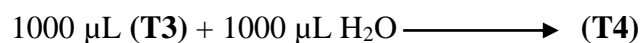
2. Para llevar a 10 UE



3. Para llevar a 1 UE



4. Para tener 0,5 UE



5. Coger 4 tubos despirogenados y etiquetar de la siguiente manera:

- Tubo 1: 2λ
- Tubo 2: λ
- Tubo 3: $\lambda/2$
- Tubo 4: $\lambda/4$

6. En cada tubo realizar el siguiente procedimiento:

- $2\lambda = 100 \mu\text{L (T4)} \longrightarrow 0,5 \text{ UE}$
- $\lambda = 100 \mu\text{L (T4)} + 100 \mu\text{L H}_2\text{O} \longrightarrow 0,25 \text{ UE}$
- $\lambda/2 = 100 \mu\text{L (T4)} + 100 \mu\text{L H}_2\text{O} \longrightarrow 0,125 \text{ UE}$
- $\lambda/4 = 100 \mu\text{L (T4)} + 100 \mu\text{L H}_2\text{O} \longrightarrow 0,0625 \text{ UE}$

7. Los últimos $100 \mu\text{L (T4)}$ desechar.

8. Anadir $100 \mu\text{L}$ del reactivo LAL en todos los tubos, agitar en el vortex y colocarlos a 37°C por una hora.

9. Observar los resultados por medio de la inversión de 180° de cada tubo de reacción.

- **Positivo:** Presencia de coágulo
- **Negativo:** Ausencia de coágulo

2.4.3.4 Cálculo del Máximo Valor de Dilución

Se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{MDV} = \frac{(\text{Límite de endotoxina UE/mL} \times \text{Concentración de la muestra})}{\text{Sensibilidad de LAL}}$$

El cálculo se lo realiza para cada principio activo, en este caso las tres vitaminas: tiamina clorhidrato, piridoxina clorhidrato y cianocobalamina.

- **TIAMINA CLORHIDRATO (Vit B1)**

Concentración del principio activo: 100mg/2mL.

Límite de endotoxina: 3.5 UE/mg (Referencia USP 35)

Sensibilidad de LAL: 0.25 UE/mL

$$\text{MDV} = \frac{\text{Límite de endotoxina UE/mL} \times \text{Concentración de la muestra}}{\text{Sensibilidad de LAL } (\lambda)}$$

$$\text{MDV} = (3.5 \text{ UE/mg} \times 100\text{mg}/2\text{mL}) / 0.25 \text{ UE/mL}$$

$$\text{MDV} = 700$$

$$\text{MDV} = 1:700$$

- **PIRIDOXINA CLOHIDRATO (Vit B6)**

Concentración del principio activo: 100mg/2mL.

Límite de endotoxina: 0.4 UE/mg (Referencia USP 35)

Sensibilidad de LAL: 0.25 UE/mL

$$\text{MDV} = \frac{\text{Límite de endotoxina UE/mL} \times \text{Concentración de la muestra}}{\text{Sensibilidad de LAL } (\lambda)}$$

$$\text{MDV} = (0.4 \text{ UE/mg} \times 100\text{mg}/2\text{mL}) / 0.25 \text{ EU/mL}$$

$$\text{MDV} = 80$$

$$\text{MDV} = 1:80$$

- **CIANOCOBALAMINA (Vit B12)**

Concentración del principio activo: 10mg/2mL.

Límite de endotoxina: 0.4 UE/μg (Referencia USP 35)

Sensibilidad de LAL: 0.25 UE/mL

$$\text{MDV} = \frac{\text{Límite de endotoxina UE/mL} \times \text{Concentración de la muestra}}{\text{Sensibilidad de LAL } (\lambda)}$$

$$\text{MDV} = (0.4 \text{ UE}/\mu\text{g} \times 10000\mu\text{g}/2\text{mL}) / 0.25 \text{ UE/mL}$$

$$\text{MDV} = 8000$$

$$\text{MDV} = 1:8000$$

En este caso como se trata de un producto que contiene 3 principios activos entonces lo ideal para la determinación de las siguientes pruebas es seleccionar dos diluciones, es decir, el máximo valor de dilución inferior y el máximo valor de dilución superior, que en este caso serán las vitaminas piridoxina y cianocobalamina.

2.4.3.5 Ensayo preliminares SPIKE y UNSPIKE

Para el desarrollo de la prueba se evaluó adicionalmente la influencia del pH en los resultados, por lo tanto, cada ensayo realizado tanto de la piridoxina como de la cianocobalamina fue analizado con y sin ajuste de pH. La solución utilizada para el ajuste fue el hidróxido de sodio 0.1 N despirogenado, debido a que este inyectable es de naturaleza ácida.

ENSAYO CONSIDERANDO EL MÁXIMO VALOR DE DILUCIÓN (1:8000)

CIANOCOBALAMINA (Vit. B12)

▪ Desarrollo del Sistemas de diluciones:

Las diluciones son representadas de la siguiente manera:

TABLA Nº 8 SISTEMA DE DILUCIONES

NÚMERO DE TUBO	DILUCIÓN
1	1
2	1:2
3	1:4
4	1:8
5	1:16
6	1:32
7	1:64
8	1:128

Fuente: Metodología Interna Ginsberg

NÚMERO DE TUBO	DILUCIÓN
9	1:256
10	1:512
11	1:1024
12	1:2048
13	1:4096
14	1:8000
15	Control Negativo

ENSAYO UNSPIKE (Diluciones de producto sin adición de endotoxina bacteriana)

1. Codificar los tubos de acuerdo con el número que resultan según los cálculos, es decir, del 1 al 15.
2. En el tubo 1 colocar 200uL del inyectable sin diluir (producto puro).
3. Añadir 100uL de LRW en los tubos del número 2 al 13.
4. Posteriormente realizamos disoluciones cogiendo 100 uL de muestra del tubo 1 y colocamos en el tubo 2, agitar cuidadosamente. Del tubo 2 tomar 100 uL y adicionar en el tubo 3, agitar y realizar el mismo procedimiento hasta terminar la serie de tubos, los últimos 100 uL de la última dilución se desechan.
5. En el tubo 14 adicionar 100 uL de la dilución 1:8000

6. El control negativo sería un tubo con la numeración 15 el cual solamente contendrá 100 uL de agua despirogenada.
7. Cuidadosamente añadimos 100uL del LAL 0.25 UE/mL a los 15 tubos incluido el control negativo.
8. Agitar en el vortex e incubar a una temperatura de 37°C por 1 hora.
9. Observar los resultados invirtiendo los tubos.

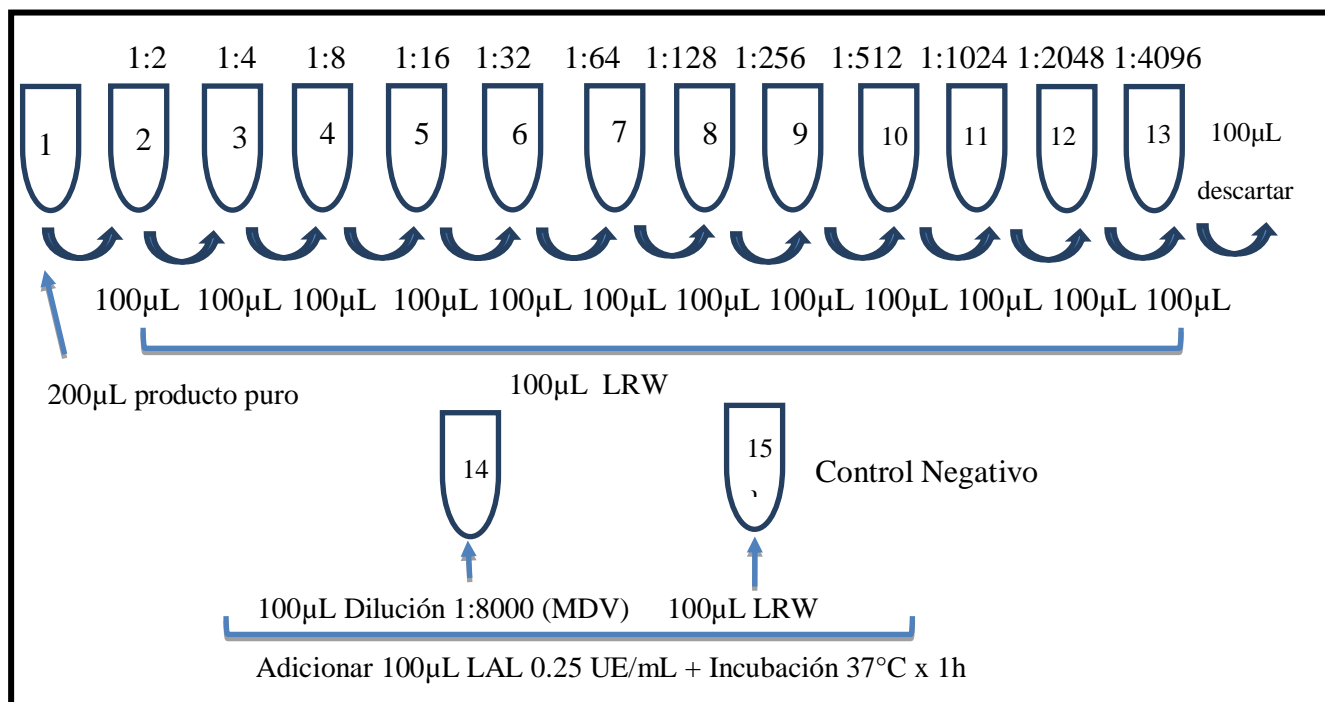


GRÁFICO N° 1. ENSAYO UNSPIKE CIANOCOBALAMINA. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.

ENSAYO SPIKE (Diluciones del producto diluido en endotoxina)

1. Codificar los tubos con el número de la disolución del 1 al 15.
2. En el tubo 1 colocar 190uL de inyectable con 10uL de endotoxina de concentración 10 UE/mL.
3. Añadir 100uL de endotoxina 0.5 UE/mL en los tubos siguientes, es decir del 2 al 13.
4. Posteriormente realizamos disoluciones cogiendo 100 uL y depositándolos en el tubo siguiente hasta llegar al tubo 13 en donde se desecha los últimos 100 uL de la última dilución.

5. En un tubo 14 colocar 190 uL de la máxima dilución valida (MVD) 1:8000 más 10uL de endotoxina de concentración 10UE/mL, agitar cuidadosamente y desechar 100 uL.
6. El control negativo sería el tubo con la numeración 15 el cual solamente contendrá 100 uL de agua despirogenada.
7. Cuidadosamente añadimos 100ul del LAL 0.25 UE/mL a los 15 tubos incluido el control negativo.
8. Agitar en el vortex e incubar a una temperatura de 37°C por 1 hora.
9. Observar los resultados invirtiendo los tubos.

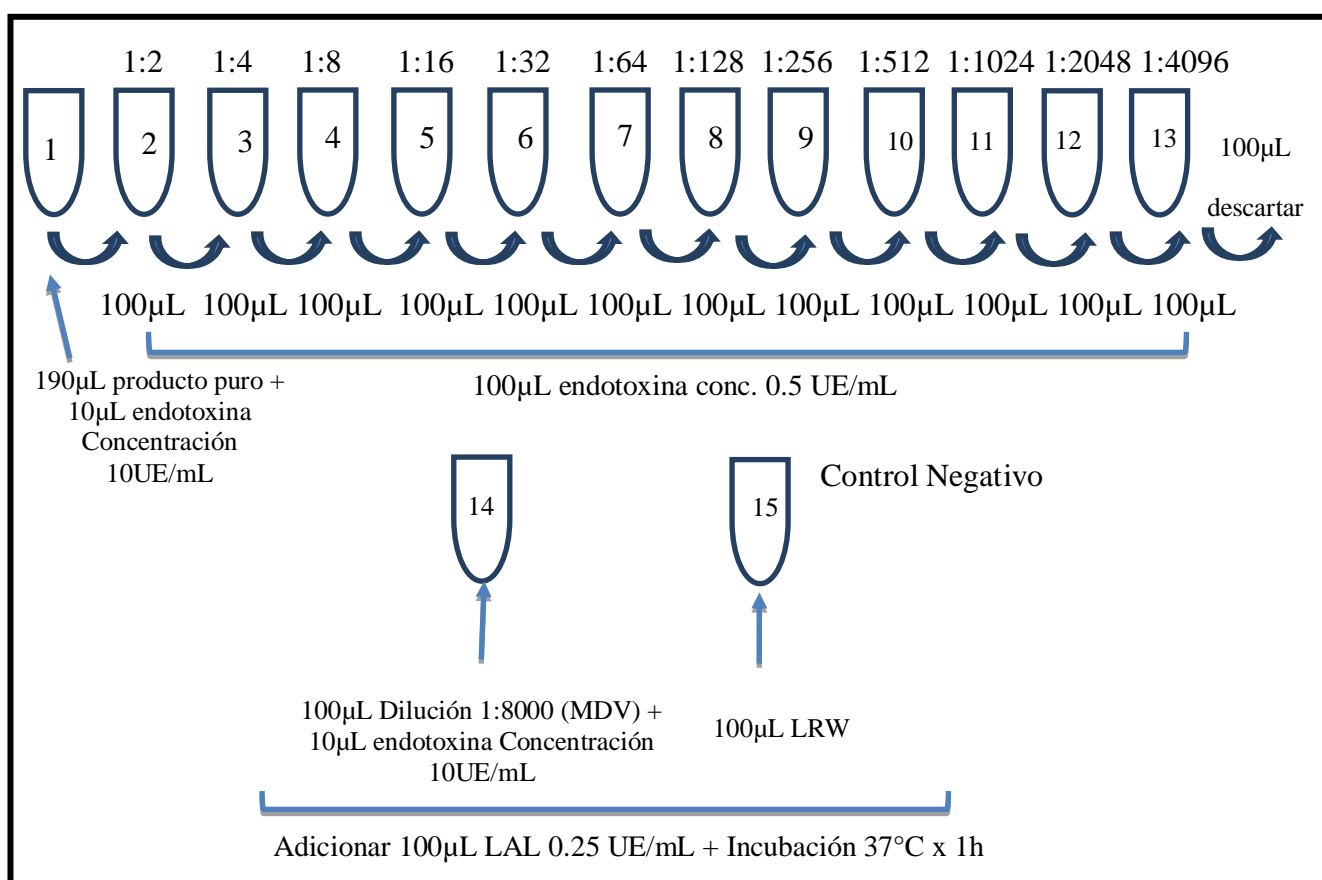


GRÁFICO N° 2. ENYAYO SPIKE CIANOCOBALAMINA, ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.

ENSAYO CONSIDERANDO EL MÍNIMO VALOR DE DILUCIÓN (1:80)

PIRIDOXINA CLORHIDRATO (Vit B6)

- **Desarrollo del Sistemas de diluciones:**

Las diluciones son representadas de la siguiente manera:

TABLA Nº 9 SISTEMA DE DILUCIONES

NÚMERO DE TUBO	DILUCIÓN		
1	1	5	1:16
2	1:2	6	1:32
3	1:4	7	1:64
4	1:8	8	1:80
		9	Control Negativo

FUENTE: METODOLOGÍA INTERNA GINSBERG.

ENSAYO UNSPIKE (Diluciones de producto sin adición de endotoxina bacteriana)

1. Preparar una serie de tubos y codificarlos de acuerdo con el número que resultan según los cálculos, es decir, del 1 al 9.
2. En el tubo 1 colocar 200uL del inyectable sin diluir (producto puro).
3. Añadir en los tubos del 2 al 7 100uL de LRW.
4. Realizar disoluciones cogiendo 100 uL de muestra del tubo 1 y colocamos en el tubo 2, agitar cuidadosamente. Del tubo 2 tomar 100 uL y adicionar en el tubo 3, agitar y realizar el mismo procedimiento hasta terminar la serie de tubos, los últimos 100 uL de la última dilución del tubo 7 se desecha.
5. En el tubo 8 adicionar 100 uL de la dilución 1:80
6. El tubo 9 se denomina control negativo ya que este contiene solamente 100 uL de agua despirogenada.
7. Finalmente añadimos 100ul del LAL 0.25 UE/mL a los 9 tubos incluido el control negativo.
8. Agitar en el vortex e incubar a una temperatura de 37°C por 1 hora.

9. Observar los resultados invirtiendo los tubos.

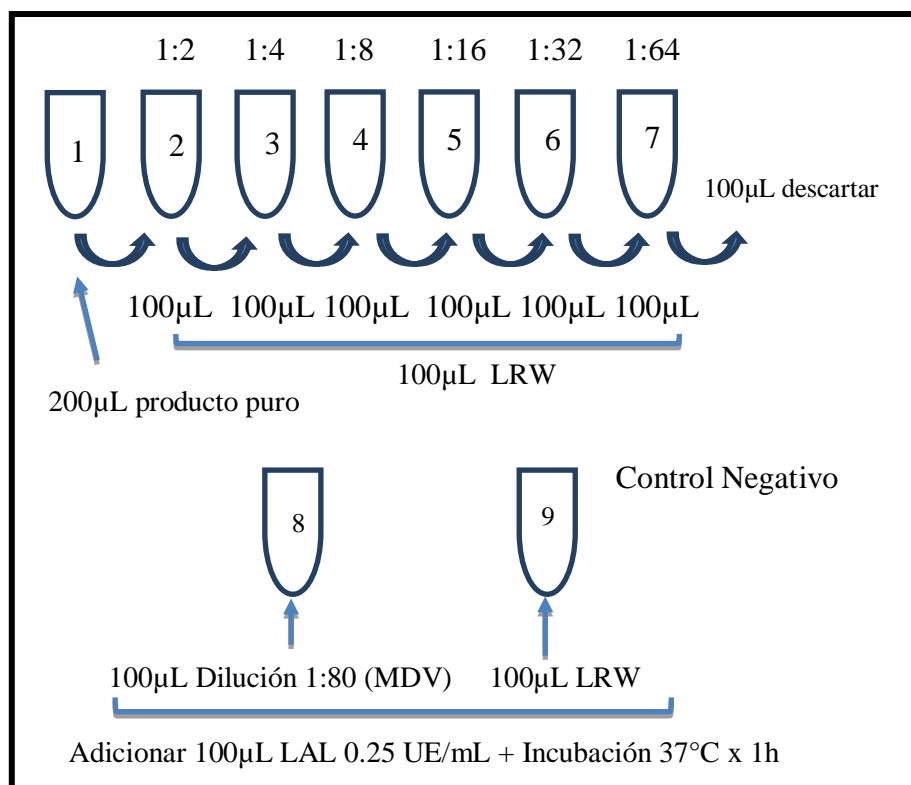


GRÁFICO N° 3. ENSAYO UNSPIKE PIRIDOXINA. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.

ENSAYO SPIKE (Diluciones del producto diluido en endotoxina)

1. Codificar los tubos con el número de la disolución del 1 al 9.
2. En el tubo 1 adicionar 190 uL de inyectable, es decir, del producto puro más 10 uL de endotoxina de concentración 10 UE/mL.
3. En los tubos del 2 al 7 añadir 100 uL de endotoxina 0.5 UE/mL.
4. Posteriormente realizamos disoluciones cogiendo 100 uL y depositándolos en el tubo siguiente hasta llegar al tubo 7 en donde se desecha los últimos 100 uL.
5. En un tubo 8 colocar 190 uL de la máxima dilución valida (MVD) 1:80 más 10 uL de endotoxina de concentración 10 UE/mL, agitar cuidadosamente y desecher 100 uL.
6. El tubo 9 se usa como control negativo el cual únicamente contendrá 100 uL de agua despirogenada.

7. Cuidadosamente añadimos 100ul del LAL 0.25 UE/mL a los 9 tubos incluido el control negativo.
8. Agitar en el vortex e incubar a una temperatura de 37°C por 1 hora.
9. Observar los resultados invirtiendo los tubos.

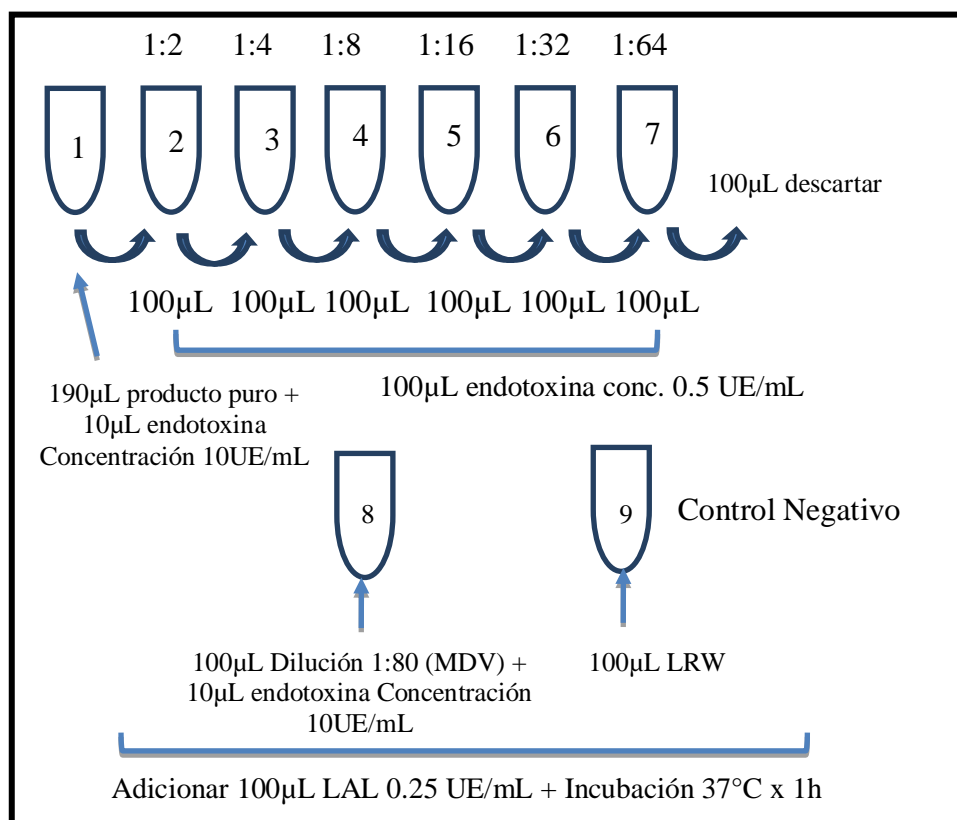


GRÁFICO N° 4. ENSAYO SPIKE PIRIDOXINA. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.

SELECCIÓN DE LA DILUCIÓN DE TRABAJO

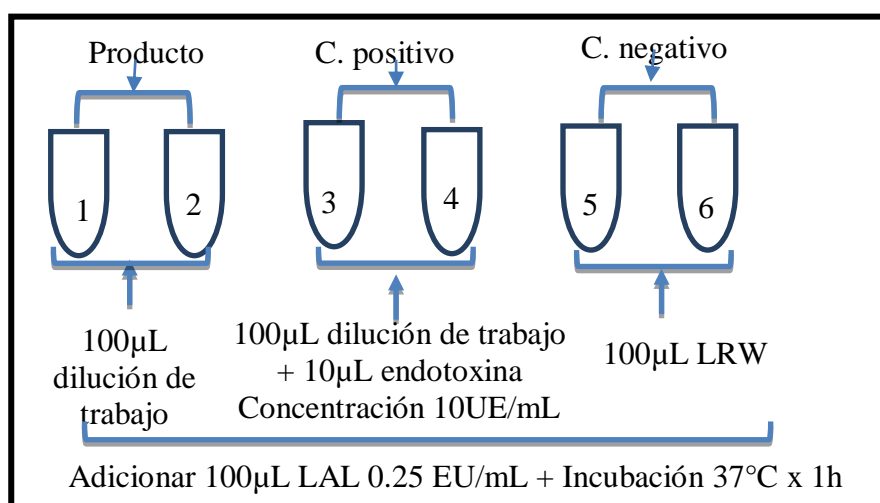
Después de realizar los ensayos preliminares y de acuerdo con los resultados obtenidos, se selecciona la dilución positiva es decir en la que se haya formado el coágulo, esta debe ser 2 veces mayor que la primera dilución en la cual ya se presentó por primera vez el coágulo o gel, esto se realiza con el fin de determinar una dilución óptima para los ensayos teniendo en cuenta el máximo valor de dilución (MVD).

2.4.3.6 Ensayo de rutina

Este ensayo es realizado para cada análisis del producto farmacéutico Intravit 10.000 Blispack, utilizando la dilución de trabajo que resultó de los ensayos anteriormente realizados.

El ensayo de rutina es realizado por duplicado con el objetivo de comprobar los resultados obtenidos. El procedimiento es el siguiente:

1. Codificar 6 tubos despirogenados con la siguiente identificación: 2 tubos como control positivo, 2 como control negativo y 2 con el nombre del producto.
2. En los 2 tubos que están codificados con el nombre del producto añadimos 100µL del producto diluido según la dilución del trabajo.
3. En los tubos del control positivo colocamos 100µL del producto diluido según la dilución de trabajo más 10µL de endotoxina 10UE/mL.
4. El control negativo contendrá 100µL de agua LAL (LRW).
5. Finalmente adicionar en los 6 tubos 100µL del reactivo LAL, agitamos suavemente, cubrimos los tubos con parafilm e incubamos a una temperatura de 37°C durante una hora.
6. Luego de haber transcurrido este tiempo leemos los resultados girando los tubos 180° mediante la formación de un coagulo firme y reportamos el resultado como positivo o negativo.



**GRÁFICO N° 5. ENSAYO DE RUTINA. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA.
DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD
GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.**

2.4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En la validación de la prueba de esterilidad mediante la técnica de filtración por membrana no se realiza un análisis estadístico debido a que dicha validación se encuentra ubicada dentro de la categoría IV (Tabla 1), en la cual solo se especifica la presencia o ausencia de microorganismos.

En la determinación de pirógenos se realiza el cálculo de desviación estándar y la media geométrica. El resultado del punto final, es decir, última dilución positiva, deberá ser mayor o igual a 0.5λ (0.125 EU/mL) y menor o igual a 2λ (0.50 EU/mL), según requerimientos de las farmacopeas oficiales.

CAPÍTULO III

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ESTERILIDAD

La prueba de esterilidad que se sometió al proceso de validación fue la filtración por membrana, debido a que esta técnica es considerada la más recomendada por la USP y Farmacopeas para realizar este tipo de análisis.

Los medios de cultivo que se utilizaron fueron el Tioglicolato para *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium sporogenes*, *Bacillus subtilis spizizenili* y TSB (Caldo de soya trípica) para *Cándida albicans* y *Aspergillus brasiliensis*.

Se realizó las siguientes pruebas con los siguientes resultados:

3.1.1 PRUEBA DE ESTERILIDAD

CUADRO N° 1. RESULTADO DE LA PRUEBA DE ESTERILIDAD. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA.
DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A.
QUITO. AGOSTO DEL 2014.

MEDIO DE CULTIVO	TEPERATURA	TIEMPO	TURBIDEZ	RESULTADO
Tioglicolato	37°C ±0,5	14 días	Ausencia	Positivo
TSB (Caldo de soya trípica)	25°C ± 0,5	14 días	Ausencia	Positivo

La prueba de esterilidad fue realizada con el objetivo de verificar la completa esterilidad de los medios de cultivo utilizados, en este caso, Tioglicolato y TSB (Caldo de soya trípica), en los cuales se evidenció como resultado la ausencia de turbidez en los medios después de haber transcurrido un lapso de tiempo de 14 días.

Con los resultados obtenidos se verificó que los medios están en las condiciones normales y óptimas de esterilidad para ser utilizados en las siguientes pruebas y por lo tanto no existirán errores que puedan interferir de manera negativa en resultados posteriores.

3.1.2 PRUEBA DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO

CUADRO N° 2 RESULTADO DE LA PRUEBA DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.

MEDIO DE CULTIVO	MICROORGANISMO	TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	TIEMPO	TURBIDEZ	RESULTADO
TIOGLICOLATO	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	37°C ±0,5	5 días	Presencia	Positivo
	<i>Staphylococcus aureus</i>	37°C ±0,5	5 días	Presencia	Positivo
	<i>Clostridium sporogenes</i>	37°C ±0,5	5 días	Presencia	Positivo
	<i>Bacillus subtilis</i> <i>spizizenili</i>	37°C ±0,5	5 días	Presencia	Positivo
TSB (Caldo de soya trípica)	<i>Cándida albicans</i>	25°C ± 0,5	5 días	Presencia	Positivo
	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	25°C ± 0,5	5 días	Presencia	Positivo

Esta prueba fue realizada con la utilización de 6 microorganismos (Tabla N° 7), en donde se comprobó que tanto el Tioglicolato como el TSB contienen los nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo de las bacterias y hongos utilizados.

Dicho crecimiento estuvo favorecido gracias a la presencia de un alto número de nutrientes que cada medio de cultivo posee dentro de su composición. El caldo Tioglicolato contiene como sustancias nutritivas la dextrosa que es utilizada como fuente de carbono, el cloruro de sodio que actúa como agente isotónico, el digerido pancreático y el extracto de levadura que proporcionan una excelente fuente de nitrógeno, todos estos nutrientes permitieron el desarrollo de colonias de *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium sporogenes* y *Bacillus subtilis spizizenili*.

Mientras que el caldo TSB permitió el crecimiento de *Cándida albicans* y *Aspergillus brasiliensis*, los mismos que se multiplicaron gracias a la presencia de nutrientes como: dextrosa que proporciona carbono, digerido pancreático de caseína, digerido pancreático de soya y cloruro de sodio que al igual que el Tioglicolato este componente actúa como fuente isotónica. Este medio de cultivo a más de permitir el crecimiento de hongos y levaduras es considerado como un medio universal, ya que, está libre de cualquier sustancia inhibitoria.

El crecimiento de dichos microorganismos se evidenció mediante la presencia de turbidez de los medios los mismos que fueron confirmados a través de identificación morfológica tanto macroscópica como microscópica mediante coloración Gram.

3.1.3 PRUEBA DE FUNGISTASIS Y BACTERIOSTASIS PARA *S. aureus*, *C. sporogenes* y *B. subtilis*

CUADRO N° 3. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE FUNGISTASIS Y BACTERIOSTASIS PARA *S. aureus*, *C. sporogenes*, *B. subtilis* y *P. aeruginosa*. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.

# RÉPLICA	MEDIO DE CULTIVO	TEMPERATURA	TIEMPO	MICROORGANISMOS			
				<i>S. aureus</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
R1	TSA	37°C ±0,5	24 h	+	+	+	+
R2	TSA	37°C ±0,5	24 h	+	+	+	+
R3	TSA	37°C ±0,5	24 h	+	+	+	+
R4	TSA	37°C ±0,5	24 h	+	+	+	+
R5	TSA	37°C ±0,5	24 h	+	+	+	+
C. POSITIVO				+	+	+	+
C. NEGATIVO				-	-	-	-

3.1.4 PRUEBA DE FUNGISTASIS Y BACTERIOSTASIS PARA *P. aeruginosa*, *C. albicans* y *A. brasiliensis*.

CUADRO N° 4. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE FUNGISTASIS Y BACTERIOSTASIS PARA *C. albicans* y *A. brasiliensis*. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.

# RÉPLICA	MEDIO DE CULTIVO	TEMPERATURA	TIEMPO	MICROORGANISMOS	
				<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
R1	SAB	25°C ± 0,5	7 días	+	+
R2	SAB	25°C ± 0,5	7 días	+	+
R3	SAB	25°C ± 0,5	7 días	+	+
R4	SAB	25°C ± 0,5	7 días	+	+
R5	SAB	25°C ± 0,5	7 días	+	+
C. POSITIVO				+	+
C. NEGATIVO				-	-

Los resultados obtenidos permiten verificar que el producto farmacéutico Intravit no posee actividad fungistática y bacteriostática producida por algún principio activo o sus excipientes, debido a que, no se produjo la interrupción del desarrollo por inhibición del crecimiento y reproducción de las 6 cepas de microorganismos tanto hongos como bacterias respectivamente.

La efectividad de esta prueba se evidenció mediante la formación de colonias en cada réplica y en el control positivo el cual contiene únicamente el inóculo del microorganismo. El control negativo no presentó ningún tipo de microorganismos, permitiéndonos verificar la esterilidad del área de trabajo, del medio de cultivo y del analista.

3.1.5 VALIDACIÓN DEL PRODUCTO

CUADRO N° 5. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL PRODUCTO FARMACÉUTICO INTRAVIT. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.

MEDIO DE CULTIVO	# RÉPLICA	TEMPERATURA	TIEMPO	TURBIDEZ	RESULTADO
TIOGLICOLATO	R1	37°C ±0,5	14 días	Ausencia	Positivo
	R2	37°C ±0,5	14 días	Ausencia	Positivo
	R3	37°C ±0,5	14 días	Ausencia	Positivo
	C. negativo	37°C ±0,5	14 días	Ausencia	Positivo
TSB (Caldo de soja de tréptica)	R1	25°C ± 0,5	14 días	Ausencia	Positivo
	R2	25°C ± 0,5	14 días	Ausencia	Positivo
	R3	25°C ± 0,5	14 días	Ausencia	Positivo
	C. negativo	25°C ± 0,5	14 días	Ausencia	Positivo

En la filtración del producto farmacéutico, siendo esta la prueba final de la validación, se obtuvo como resultado la ausencia total de microorganismos tanto para bacterias como para hongos después de transcurrir los 14 días de incubación.

Estos resultados fueron evidenciados por la ausencia de turbidez de los medios de Tioglicolato y TSB resultando positiva la validación de esta prueba de esterilidad por membrana permitiéndonos decir que el producto farmacéutico parenteral Intravit 10.000 Blispack se encuentra libre de cualquier tipo de contaminación que pudiera afectar la salud de la sociedad que se la administre y que en lugar de ello va a cumplir con el efecto farmacológico para el que está orientado con relación a su composición.

3.2 DETERMINACIÓN DE PIRÓGENOS

3.2.1 CURVA ESTÁNDAR

CUADRO N° 6. RESULTADOS DE LA CURVA ESTÁNDAR. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.

RÉPLICA	CONTROL NEGATIVO	0.50 UE/mL (2λ)	0.25 UE/mL (1λ)	0.125 UE/mL (0.5λ)	0.0625 UE/mL (0.25λ)
1	-	+	+	-	-
2	-	+	+	-	-
3	-	+	+	-	-
4	-	+	+	-	-

CUADRO N° 7. RESULTADOS DE LA SENSIBILIDAD DEL RÓTULO. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.

MUESTRAS	PF (UE/mL)	Log PF
1	0.25	-0.60206
2	0.25	-0.60206
3	0.25	-0.60206
4	0.25	-0.60206
Sumatoria		-2.40824
Promedio		-0.60206
MG= Antilog (Sumatoria de log/número de réplicas)		0.25

El resultado del punto final (última dilución positiva) es de 0.25 UE/mL, valor que se encuentra dentro de las especificaciones, es decir, ≥ 0.125 UE/mL y ≤ 0.50 UE/mL, dicho valor coincide con el declarado en la etiqueta del Reactivo *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL).

Con el cálculo realizado de la media geométrica y con el resultado obtenido se verifica y se confirma la sensibilidad del rótulo del reactivo LAL.

3.2.2 CÁLCULO DEL MÁXIMO VALOR DE DILUCIÓN (MVD)

Como resultado del cálculo del máximo valor de dilución (MVD) de los tres principios activos del Intravit, se obtuvo los siguientes resultados:

- **TIAMINA CLORHIDRATO (Vit B1)**

MDV= 1:700

- **PIRIDOXINA CLOHIDRATO (Vit B6)**

MDV= 1:80

- **CIANOCOBALAMINA (Vit B12)**

MDV= 1:8000

Como se trata de un producto farmacéutico que contiene más de un principio activo, entonces, se selecciona los principios activos que contengan el valor de dilución mayor y menor, en este caso, los próximos ensayos se realizaron con los valores obtenidos de las vitaminas piridoxina y cianocobalamina.

3.2.3 ENSAYO UNSPIKE (Diluciones de producto sin adición de endotoxina bacteriana)

ENSAYO CONSIDERANDO EL MÁXIMO VALOR DE DILUCIÓN SUPERIOR (1:8000)

CIANOCOBALAMINA (Vit. B12)

- Producto sin ajuste de pH (4.45):

CUADRO N° 8. RESULTADOS DEL ENSAYO UNSPIKE CONSIDERANDO EL (MVD) SUPERIOR SIN AJUSTE DE pH. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.

Réplica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	P. puro	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096	1:8000	CN
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- Producto con ajuste de pH (7.34):

CUADRO N° 9. RESULTADOS DEL ENSAYO UNSPIKE CONSIDERANDO EL (MVD) SUPERIOR CON AJUSTE DE pH. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.

Réplica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	P. puro	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096	1:8000	CN
1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

De acuerdo con los resultados obtenidos, en el ensayo del producto sin ajuste de pH no se evidencia presencia de endotoxina bacteriana ni en el producto puro, ni en las diluciones efectuadas hasta el máximo valor de dilución. Este resultado se mantiene en las dos réplicas realizadas.

Por otro lado, en el producto con ajuste de pH se evidencia positividad del ensayo desde el producto puro hasta la dilución 1:4, lo que indica un realce en el resultado de la prueba cuando el producto está concentrado, este puede ser ocasionado por algún compuesto que produzca una interferencia induciendo a una reacción enzimática, por tal motivo, las diluciones para ensayos rutinarios deberán ser evaluados a partir de la dilución 1:8, desde donde la interferencia ya no es detectada.

ENSAYO CONSIDERANDO EL MÁXIMO VALOR DE DILUCIÓN INFERIOR (1:80)

PIRIDOXINA (Vit. B6)

- **Producto sin ajuste de pH (4.45):**

CUADRO N° 10. RESULTADOS DEL ENSAYO UNSPIKE CONSIDERANDO EL (MVD) INFERIOR SIN AJUSTE DE pH. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.

Réplica	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Producto puro	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:80	Control negativo
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- **Producto con ajuste de pH (7.34):**

CUADRO N° 11. RESULTADOS DEL ENSAYO UNSPIKE CONSIDERANDO EL (MVD) INFERIOR CON AJUSTE DE pH. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.

Réplica	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Producto puro	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:80	Control negativo
1	+	+	+	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Los resultados obtenidos en el ensayo UNSPIKE considerando el máximo valor de dilución menor tanto con el ajuste de pH y sin ajuste de pH fueron exactamente los mismos que los resultados obtenidos del ensayo con el máximo valor de dilución superior.

3.2.4 ENSAYO SPIKE (Diluciones del producto con adición de endotoxina bacteriana)

**ENSAYO CONSIDERANDO EL MÁXIMO VALOR DE DILUCIÓN SUPERIOR
(1:8000)**

CIANOCOBALAMINA (Vit. B12)

- **Producto sin ajuste de pH (4.45):**

CUADRO N° 12. RESULTADOS DEL ENSAYO SPIKE CONSIDERANDO EL (MVD) SUPERIOR SIN AJUSTE DE pH. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.

Réplica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	P. puro	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096	1:8000	CN
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-

- **Producto con ajuste de pH (7.34):**

**CUADRO N° 13 RESULTADOS DEL ENSAYO SPIKE CONSIDERANDO EL (MVD)
SUPERIOR CON AJUSTE DE pH. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA.
DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG
ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.**

[illegible]

El producto sin ajuste de pH presenta inhibición tanto en forma concentrada como diluida, mientras que, en el ensayo del producto con el ajuste de pH se observa que el producto puro y sus diluciones no presentan inhibición y por lo tanto, no existe interferencia que pueda afectar la ejecución de la prueba, debido a que, sus resultados son positivos hasta el MVD 1:80.

3.2.5 SELECCIÓN DE LA DILUCIÓN DE TRABAJO

Se selecciona después de realizar los ensayos de UNSPIKE y SPIKE teniendo en cuenta el máximo valor de dilución (MDV), el mismo que debe ser mínimo dos veces mayor que la primera dilución en la cual la interferencia no es evidente.

En el primer caso en el cual se utilizó el producto sin ajuste de pH no se puede determinar la dilución de trabajo debido a que se presentó una inhibición en el ensayo SPIKE, si se adopta la dilución 1:1024, se sobrepasaría los máximos valores de dilución tanto de la tiamina (1:700) como de la piridoxina (1:80), por lo que la dilución no es válida para el estudio.

En el segundo caso del producto con ajuste de pH, en base a los resultados obtenidos en los cuales no existió inhibición en el ensayo SPIKE se selecciona la dilución 1:16 como la dilución de trabajo para realizar los ensayos de rutina de este producto farmacéutico.

3.2.6 PRUEBA DE RUTINA

INTRAVIT® 10.000 BLISPACK

CUADRO N° 16 RESULTADOS DE LA PRUEBA DE RUTINA DEL PRODUCTO FARMACÉUTICO INTRAVIT. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. AGOSTO DEL 2014.

REPLICA	DILUCIÓN 1:16	CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO
1	-	+	-
2	-	+	-

En el desarrollo de la prueba de rutina del producto farmacéutico parenteral Intravit 10.000 Blispack se observó la ausencia de gelificación, este resultado indica que el producto se encuentra libre de endotoxinas.

El resultado obtenido en el control positivo y negativo fueron los esperados, ya que, en el control positivo se verificó que no existe ningún tipo de inhibición por parte del producto debido a que en dichos tubos si se produjo la formación de un gel después de transcurrir una hora de incubación. En cambio, con los resultados obtenido del control negativo, se descartó la posibilidad de que existiera contaminación en los materiales y reactivos utilizados durante la prueba, en estos tubos no existió la formación de un gel.

En cada réplica de la prueba de rutina se obtuvo los mismos resultados con lo que se comprobó que la prueba fue realizada aplicando los métodos y procedimientos de forma correcta y por lo tanto los resultados son confiables.

CAPÍTULO IV

4 CONCLUSIONES

1. Se realizó la validación de la prueba de esterilidad mediante la técnica de filtración por membrana y se determinó la ausencia de pirógenos en el producto farmacéutico inyectable “Intravit® 10.000 Blispack” de la Empresa GINSBERG ECUADOR S.A., llegando a la conclusión de que el método y las condiciones aplicadas para cada análisis son las correctas, adecuadas, seguras y por tal motivo nos proporcionarán resultados confiables.
2. Todas las pruebas y ensayos fueron realizados siguiendo estrictamente la metodología establecida por la USP 35-NF 30, arrojándonos los resultados esperados lo que permitió validar correctamente la prueba de esterilidad.
3. Se concluye que los medios de cultivo utilizados en el laboratorio se encuentran en excelentes condiciones tanto de esterilidad como de composición, ya que, posee los nutrientes necesarios para permitir el desarrollo y crecimiento de microorganismos y además se puede concluir que el producto farmacéutico inyectable no posee actividad fungistática y bacteriostática.
4. Mediante los resultados obtenidos de las pruebas: esterilidad de los medios de cultivo, promoción de crecimiento, fungistasis y bacteriostasis y la filtración del producto, se concluye que el inyectable “INTRAVIT® 10.000 BLISPACK” cumple con los parámetros de validación.

Por lo tanto, se cumple de manera correcta con la especificidad, parámetro que evalúa un analito en presencia de impurezas, en este caso microorganismos. La determinación de este parámetro de validación se llevó a cabo al ubicar la prueba de esterilidad mediante la técnica de filtración por membrana en la categoría IV especificada en la Tabla N°1 Categoría de los Métodos Analíticos tomado de la USP 24, Capítulo 12, debido a que, esta validación se basa específicamente en determinar la presencia o ausencia de microorganismos.

5. Además, al realizar la prueba de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) mediante el método GEL-CLOT, se verificó la ausencia de pirógenos en el inyectable “INTRAVIT® 10.000 BLISPACK”, el mismo que se encuentra apto para ser administrado con la seguridad y confianza de que no causará daño a los pacientes.
6. En la prueba de LAL, se logró determinar el máximo valor dilución mediante la aplicación de cálculos y con la utilización de los datos adecuados, valor que fue utilizado en el transcurso del ensayo y que mediante éste se pudo obtener la dilución de trabajo, misma que es útil específicamente para cada ensayo de rutina del inyectable “INTRAVIT® 10.000 BLISPACK”.
7. Se verificó que la prueba de esterilidad y la determinación de pirógenos realizados en el laboratorio de microbiología de la Empresa GINSBERG S.A. para productos farmacéuticos parenterales es la adecuada y apropiada, ya que, permite cumplir con los parámetros de calidad.

CAPÍTULO V

5 RECOMENDACIONES

1. Todo el desarrollo de la tesis, es decir, la validación y la determinación de pirógenos debe ser realizada en un ambiente estéril, específicamente en la cámara de flujo laminar, con el fin de evitar cualquier tipo de contaminación que pueda interferir con los resultados.
2. Es recomendado utilizar los materiales el mismo día en los que son preparados, despirogenados y esterilizados en cada prueba respectivamente.
3. Tanto los materiales como los medios de cultivo utilizados para la validación de la prueba de filtración por membrana deben estar debidamente esterilizados en el autoclave, el mismo que alcanza una temperatura de 121°C y el proceso se lleva a cabo en 15 minutos.
4. Los equipos que intervienen en cada prueba y ensayo desarrollado deben estar validados o calibrados, esto nos proporcionará mayor confianza en cada dato o resultado obtenido.
5. Los materiales utilizados en la determinación de pirógenos deben ser despirogenados en el tiempo y temperatura apropiado, es decir, durante 3 horas y a una temperatura de 220°C.

6. Las cepas puras de microorganismos utilizadas en cada prueba deben ser tratadas con cuidado y de la mejor manera posible, con el propósito de evitar contaminaciones del laboratorio de microbiología con las cepas.
7. Al realizar la prueba de LAL es importante regular el pH del inyectable, ya que este parámetro al no ser controlado actúa como interferencia en la obtención de resultados. De la misma manera, se debe tener cuidado al reconstituir el reactivo LAL por lo que se recomienda dejar en reposo el reactivo por un lapso de tiempo de 10 minutos hasta que se produzca una completa disolución, evitando agitaciones fuertes que pudieran producir la formación de burbujas.
8. Los reactivos de LAL y las cepas de microorganismos deben estar almacenados a las condiciones apropiadas para su conservación, por lo tanto, deben permanecer en refrigeración a una temperatura de 2-8°C.
9. Es recomendado realizar una validación posterior en caso de que se realice algún cambio en la metodología, procedimiento de análisis o cambio de analista.
10. Al finalizar el proceso de validación se debe documentar cada resultado obtenido mediante la utilización de documentos formales, los mismos, que permanecerán en la Empresa como respaldo de que cada metodología utilizada en la Industria Farmacéutica Ginsberg ha sido debidamente validado.

BIBLIOGRAFÍA

ARIAS, J. y CORTÉS, A. (2003). Validación de la prueba de esterilidad para vacunas virales. pp. 36-43.

ARRIOLA, L. (2012). Validación de Métodos Analíticos, Fisicoquímicos y Microbiológicos. (Guatemala). pp. 6.

AVENDAÑO, J. y MOYANO, E. (1997). Desafío de los métodos, filtración por membrana frente a placa fluida para análisis microbiológico en bebidas alcohólicas. Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. (Bogotá). pp. 46-78.

BURGUET, N. y BRITO, L. (2012). Validación del método LAL para determinar endotoxinas bacterianas en el inyectable heparina sódica. Vaccimonitor. Buenos Aires. (Argentina). pp. 1-5.

CECMED. (1994). Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos. Regulación 5 Principios generales para la validación de los procesos en la industria farmacéutica. (Barcelona). pp. 97.

COOPER, J. (1991). Validación del método de LAL para endotoxinas bacterianas. Vol. 2. pp. 6-10.

DAWSON, M. (2003). Soluciones Inyectables. Tecnología Farmacéutica. (Bogotá). pp. 26-34.

GALEANO, N. (2007). Microbiología Industrial. (Bogotá). pp. 16-18.

VADEMECUM. Cianocobalamina. GARCÍA. A. 2006.

<http://www.cun.es/enfermedadestratamientos/medicamentos/cianocobalamina>.

2014-06-25.

GINSBERG. (2014). METODOLOGÍA INTERNA. (Quito).

HELMAN, J. (1981). Farmacotecnia Teórica y Práctica. 4ta ed. CECSA. (México). pp. 1381-1400.

HUGO, W. y RUSSEL, A. (1998). Microbiología Farmacéutica. 6ta ed. Blackwell Science. (Gran Bretaña). pp. 19-23, 310-322.

INFOLEG. Prueba de lisado de Amebocitos de *Limulus* (LAL). LEVIN. J. 2010.
http://www.acciusa.com/pdfs/accProduct/Pyrochrome_multilang_IFUs/PyrochromeIFU_PN000856_es_r1.pdf.

2014-06-29

MEDLINEPLUS. Tiamina y Piridoxina. CUEVA, E. 2001.

<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/002401.htm>.

2014-06-29

NEIRA, D. (2004). Validación de Bacteriostasis y Fungistasis. VECOL. (México). pp. 245-260.

ORTEGA, A. y otros. (2001). Validación de Métodos De Análisis en Microbiología. AEFI. (Colombia). pp. 141-16.

OSORIO, C. (2011). Validación de la Prueba de Endotoxinas Bacterianas LaL. (El Salvador). pp. 24-40.

PEARCE, G. (2007). Membranas: Introducción, Tratamiento y Filtración de agua y aguas residuales. Vol. 44. pp. 24-27.

REMINGTON, A. (2003). Farmacia. 20a ed. Médica Panamericana. (México). pp. 35-46.

REYES, R. (2001). Validación de Procesos como Herramienta de Mejora Continua. ICDE. (Buenos Aires). pp. 26.

SOSO, A. y otros. (1998). Validación de Métodos Analíticos. Eurachem Guide. (Argentina). pp. 5-7.

TURCO, S. y KING, M. (1974). Formas de Dosificación Estériles. 2da ed. Lea & Febiger. (Philadelphia). pp. 456.

UNODC. (2010). Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito. Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. (New York). pp. 10p.

USP 24. (2006). Validación de Métodos Analíticos. Capítulo 12. pp. 2622-2625.

USP 35-NF 30. Métodos Microbiológicos. Chapter 10. Pharmacopeial Forum: Vol. 29. pp.1-20.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (1997). Aseguramiento de la calidad de los productos farmacéuticos, un compendio de directrices y materiales relacionados. (Génova). pp. 78-110.

ZIMMER, A y SPIES, S. (1999). Control de calidad de radioactivos. Departamento de Radiología. Illinois. (Chicago). pp. 270-291.

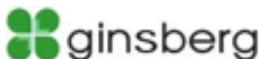


ANEXOS

ANEXO N° 1 ESPECIFICACIONES Y MÉTODO DE ANÁLISIS DEL INTRAVIT

ENSAYO	REFERENCIA	ESPECIFICACIONES
ASPECTO	Método interno	Solución inyectable transparente, de color rojo intenso, libre de partículas.
pH	USP 31	3.5 – 4.2
DENSIDAD	USP 31	0.9 – 1.3 g/mL
VOLUMEN PROMEDIO	Método interno	2.0 mL – 2,15 mL
IDENTIDAD DE:		
Tiamina HCL	USP 31	Debe cumplir
Piridoxina HCL	USP 31	Debe cumplir
Cianocobalamina	USP 31	Debe cumplir
VALORACION DE:	USP 31	
Tiamina HCL (Vitamina B1)	USP 31	90,0 - 110,0 mg / 2 mL 90,0 – 110,0 %
Piridoxina HCL (Vitamina B6)	USP 31	90,0 - 115,0 mg / 2 mL 90,0 – 115,0 %
Cianocobalamina (Vitamina B12)	USP 31	9,5 – 11,5 mg / 2mL 95,0 – 115,0 %
PRUEBA DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS LAL	USP 31 <85>	No más de 0,25 UE / mg de Vitamina B1+ Vitamina B6 + Vitamina B12
ESTERILIDAD	USP 31 <71>	Pasa la prueba de Esterilidad
MATERIAL DE ENVASE:	Método interno	Jeringa de vidrio transparente Tipo I, ámbar provista de tapón de caucho gris (poli isobutileno) y un tapón roscado de caucho gris (Poli isobutileno).

ANEXO N° 3 CERTIFICADO DE ANÁLISIS DEL ENSAYO DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS LAL


FR-AC-am-017-01

CERTIFICADO DE ANALISIS
ENSAYO DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS: LAL

N°. REPORTE: ED-009

CASA: SIONPHARM

PRODUCTO: Intravit Blispack

PRESENTACIÓN: Jeringa x 2 mL

CARGA ESTERILIZ. -

LOTE: 14885

DILUCIÓN ENSAYO: 1:18

MÉTODO: LAL

FECHA ENVASE: - / - / -

FECHA: - / - / -

ESTERILIZACIÓN:

FECHA ANÁLISIS: 06/07/ 2014

MATERIA PRIMA:

ESTABILIDAD

PROD. TERMINADO X

DATOS REACTIVOS

ENDOTOXINA ESTANDAR	REACTIVO LAL	AGUA LAL
Proveedor: Endosafe	Proveedor: Endosafe	Proveedor: Endosafe
Lote: EM21152	Lote: E4665L	Lote: AWF15828
Concentración: 1000 UE/mL	Sensibilidad: 0,25	Expira: Junio del 2016
Expira: 05/2016	Expira: 07/2016	
Fecha reconstitución: 01/04/2014	Fecha reconstitución: 01/ 04/2014	

RESULTADOS

MUESTRA	CONTROL NEGATIVO (Diluyente)	CONTROL POSITIVO (Diluyente)	CONTROL POSITIVO (Muestra)	CONCENT. ENDOTOX. Control positivo (EU/ml)
INTRAVIT	-	+	-	0.25 UE/mL

NOTA: (+) = Formación de gel
 (-) = Sin formación de gel

OBSERVACIONES:

RESULTADO FINAL: CUMPLE: x
 NO CUMPLE:

CUADERNO: Prueba de Endotoxinas LAL pág.: 193

ANALIZADO POR: _____ REVISADO POR: _____ FECHA: ____ / ____ / ____

ANEXO N° 4 FORMATO DE PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

<p>Protocolo de validación _____ Validación del proceso _____ pág. _ de ____</p> <p>Título _____</p> <p>Nombre y dirección del establecimiento _____</p> <p>Protocolo de validación N° _____ Validación del proceso _____</p> <p>Título: _____</p> <p>Protocolo redactado por: _____</p> <p>Aprobado por: _____ Fecha: _____</p> <p>Aprobación de Aseguramiento de Calidad por: _____ Fecha: _____</p>
<p>Objetivo:</p> <p>Alcance:</p> <p>Responsabilidad:</p>
<p>1. Descripción del proceso en su totalidad: subprocesos, diagrama de flujo, pasos críticos/riesgos</p> <p>- Formula Patrón:</p> <p>- Listado de POES:</p> <p>POS para las operaciones normales del proceso (utilizados para la fabricación y limpieza y sanitización) sometido a prueba (incluidos los formularios para el registro de datos y los materiales y equipos necesarios).</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>POS para las pruebas durante la fabricación, de control de calidad efectuadas durante el proceso (pruebas validadas) (incluidos los formularios para el registro de datos y los materiales y equipos necesarios).</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>POS para las pruebas específicas del estudio de validación que se efectúa (pruebas validadas) (incluidos los formularios para el registro de datos y los materiales y equipos necesarios).</p> <p>_____</p> <p>_____</p>

2. Descripción de los sistemas, equipos e instrumentos involucrados, con sus calificaciones, mantenencias y calibraciones correspondientes.

Listado sistemas/equipos/aparatos/instrumentos	Informe PQ/mantenición/ calibración (señalando fecha)	Aceptado/rechazado
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

3. Identificación de la validación de las metodologías analíticas.

Listado	Informe validación	Aceptado/rechazado
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

4. Capacitación del personal.

5. Detalles de descripción de: parámetros a controlar, plan de muestreo, frecuencia de controles, métodos de control, criterio de aceptación y análisis de riesgos identificando los parámetros críticos, entre otros.

6. Procedimiento

Funcionamiento

Proceso: Ejecutar tres veces el proceso completo de acuerdo a los POES y registrar todos los datos necesarios.

Las desviaciones de los procedimientos se registrarán en los formularios para el registro de datos.

Pruebas analíticas: efectuar las pruebas ordinarias asociadas con el proceso, en conformidad con el POS. Los resultados de las pruebas tendrán que ser aprobados por Control de Calidad.

Evaluación

Anexar todos los formularios para el registro de datos y los gráficos.

Efectuar todos los cálculos y análisis estadísticos (determinados con anterioridad) necesarios.

Comparar con los criterios de aceptación.

Preparar el informe de desviaciones.

(Incluyendo la justificación de la aceptación y la repercusión sobre el proceso).

Preparar un informe de validación del proceso

Este debe incluir para cada ciclo de validación lo siguiente: fecha de inicio del estudio; fecha de finalización; observaciones efectuadas; problemas encontrados; integridad de la información recogida; resumen del informe de desviaciones de las pruebas; y los análisis estadísticos; concordancia de los resultados con los criterios de aceptación; ubicación de los datos originales; otra información pertinente al estudio.

Aprobación

Presentar el documento a Aseguramiento de Calidad para su examen y aprobación.

El proceso debe cumplir todas las especificaciones en tres ciclos consecutivos

7. Listado de los formularios para el registro de datos que se adjuntan

Verificado por: _____ Fecha: _____

8. Cálculos y análisis estadísticos

Efectuado por: _____ Fecha: _____

Verificado por: _____ Fecha: _____

9. Criterios de aceptación comparados con los resultados de la prueba

Criterios	Resultados	Aprobado/rechazado
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

Redactado por: _____ Fecha: _____

Verificado por: _____ Fecha: _____

10. Informe de desviaciones

Desviaciones:

Justificación de la aceptación:

Impacto sobre el proceso:

Redactado por: _____ Fecha: _____

Verificado por: _____ Fecha: _____

11. Informe de validación del proceso

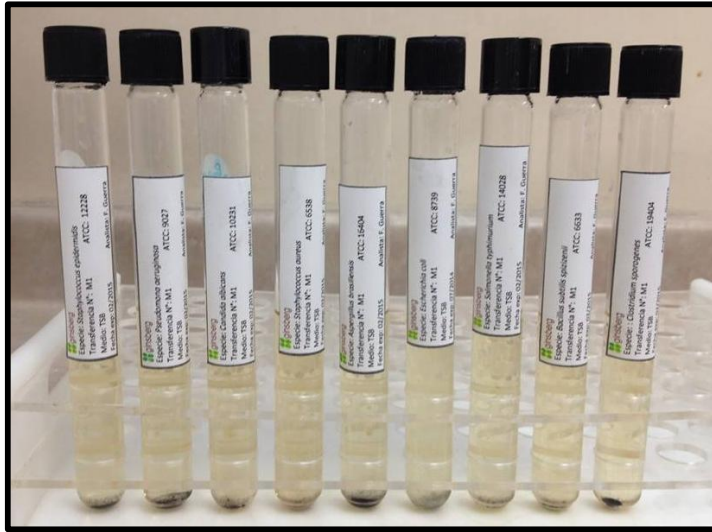
Resultados:

Conclusión:

Redactado por: _____ Fecha: _____

Aprobación de Aseguramiento de Calidad por: _____ Fecha: _____

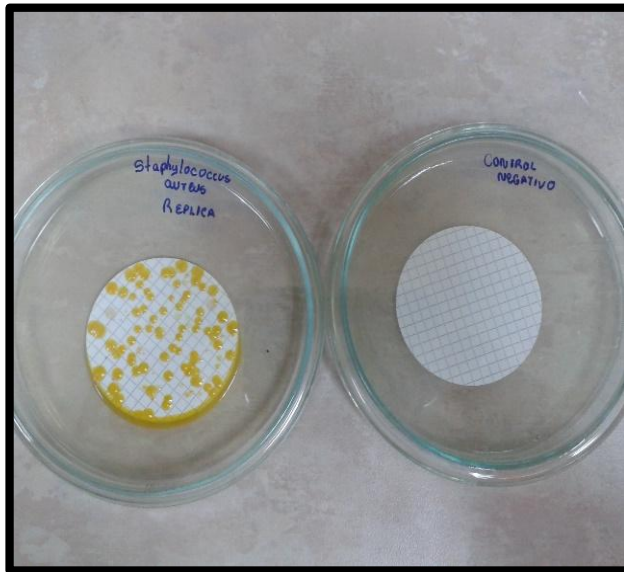
ANEXO N° 5 REHIDRATACIÓN DE LAS CEPAS



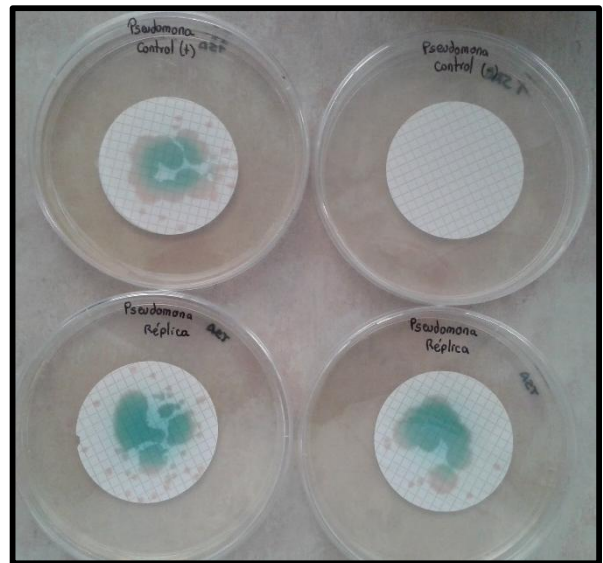
ANEXO N° 6 PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO



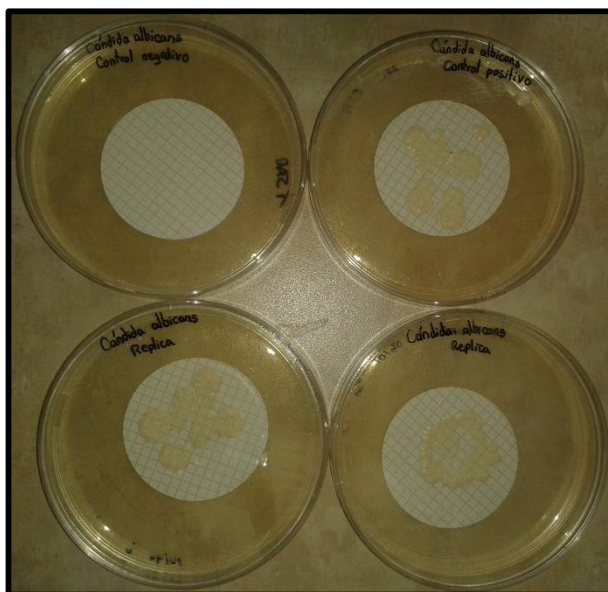
ANEXO N° 7 FUNGISTASIS Y BACTERIOSTASIS



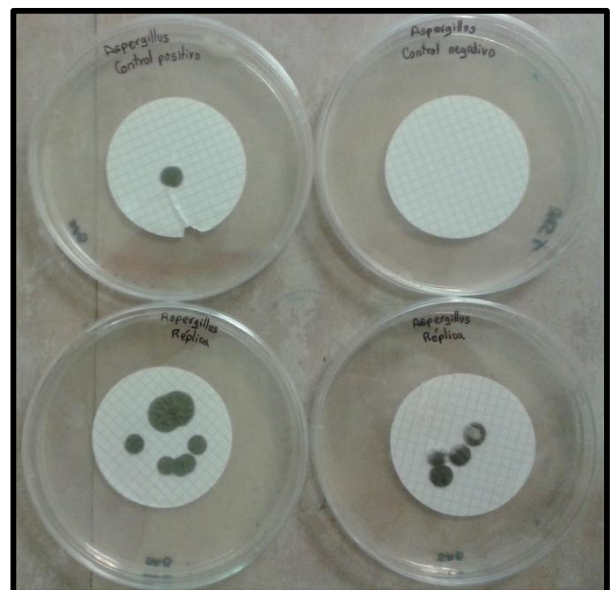
Staphylococcus aureus



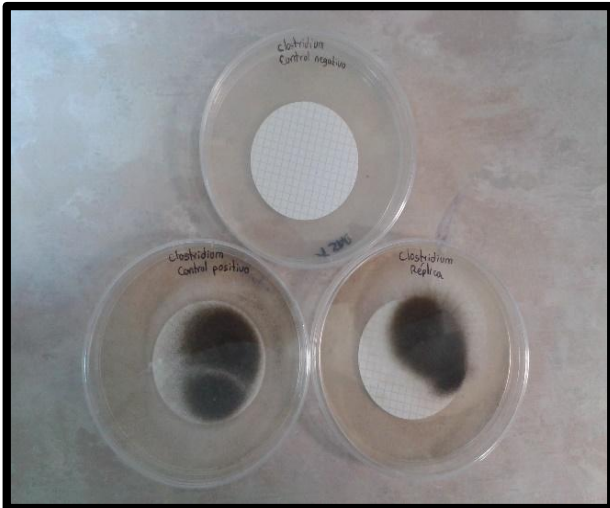
Pseudomonas aeruginosa



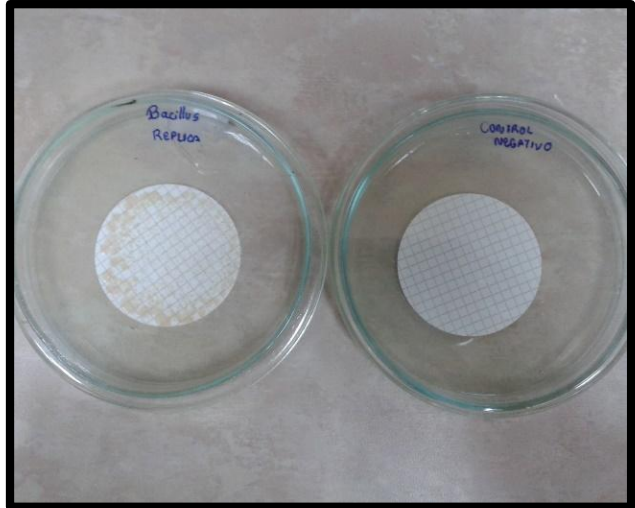
Cándida albicans



Aspergillus brasiliensis



Clostridium sporogenes

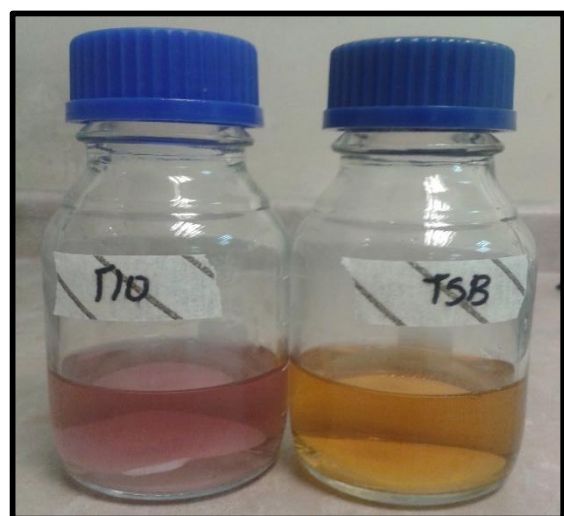


Bacillus subtilis

ANEXO N° 8 FILTRACIÓN POR MEMBRANA



Producto Filtrado



Producto después de la incubación

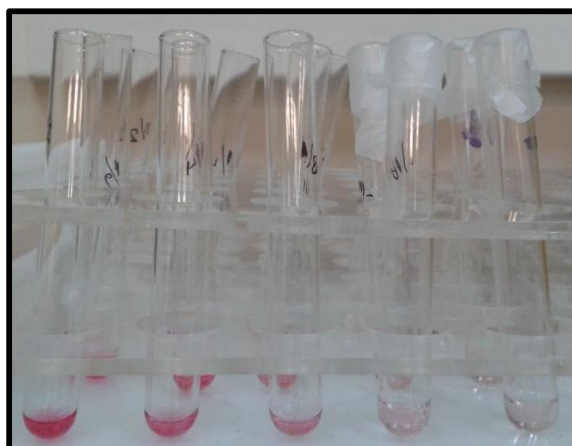
ANEXO N° 9 REACTIVOS LAL PARA LA DETERMINACIÓN DE PIRÓGENOS



ANEXO N° 10 REGULACIÓN DEL pH



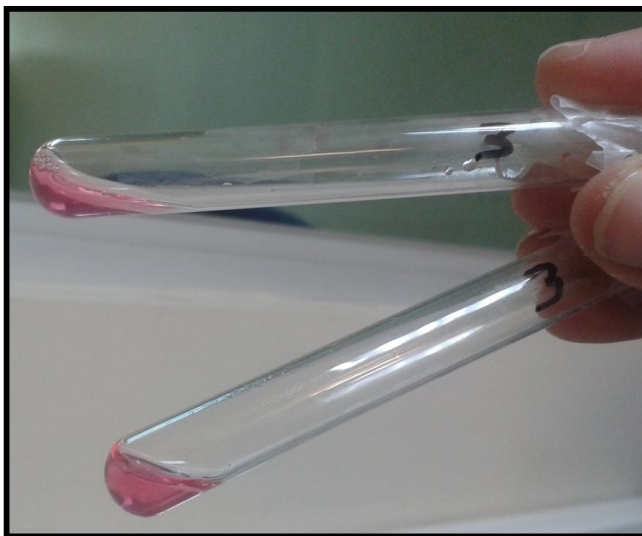
ANEXO N° 11 ENSAYO DE RUTINA



ANEXO N° 12 INCUBACIÓN DE LAS MUESTRAS



ANEXO N° 13 LECTURA DE RESULTADOS



Producto



Control Positivo

